



ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ ΕΔΑΦΩΝ ΑΠΟ ΑΝΤΙΜΟΝΙΟ

Διπλωματική εργασία της
Βασιλικής Αγγελοπούλου

Τριμελής επιτροπή
Καλογεράκης Νικόλαος (Επιβλέπων)
Καθηγήτρια Δανάη Βενιέρη
Δρ. Ευδοκία Συρανίδου

<<Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ' ολοκλήρου η τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση , αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναγράφεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης.>>

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νίκο Καλογεράκη επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας διπλωματικής για την εμπιστοσύνη και στο πολύ ενδιαφέρον θέμα που μου έδωσε. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη την κ. Δανάη Βενιέρη, μέλος της τριμελούς επιτροπής για τον χρόνο που αφιέρωσε στην ανάγνωση και την αξιολόγηση της παρούσας διπλωματικής. Στην Dr. Ευδοκία Συρανίδου, μέλος της τριμελούς επιτροπής ένα μεγάλο ευχαριστώ γιατί πέραν ότι συνεργαστήκαμε μαζί και με βοήθησε σε όλα, ήταν πάντα παρούσα στις απορίες μου και επίσης με βοήθησε να καταλάβω πράγματα για τον εαυτό μου και την εξέλιξη μου. Ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτωρ Κατερίνα Καρκανοραχάκη που με βοήθησε με τις μετρήσεις στο κυτταρόμετρο αλλά και γενικότερα σε οτιδήποτε είχα απορία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Πετρούλα Σερίδου για όλες τις συμβουλές και τις συζητήσεις που είχαμε στο εργαστήριο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Sagu Maria Liliana και την Βουτσαδάκη Στέλλα από το εργαστήριο του Καθηγητή Νικόλαου Νικολαΐδη αφού οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν απαραίτητες για την διεκπεραίωση του πειράματος. Ακόμα ευχαριστώ τον συμφοιτητή και μετέπειτα συνεργάτη Κωνσταντίνο Φυντριλάκη που με την ήρεμη δύναμη του με βοήθησε στο πείραμα καθώς και όλα τα μέλη από το εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας. Τις φίλες και συμφοιτήτριες μου Ολιάννα Ακουμιανάκη και Μαρία-Ντενίζ Ντεσσιμό για την στήριξη, την παρέα, και την εξέλιξη όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και τα αδέρφια μου που με στηρίζουν και με ανέχονται όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων από βαρέα μέταλλα στο έδαφος έχει επιβλαβείς συνέπειες στο οικοσύστημα αλλά και στην ανθρώπινη υγεία, καθώς εισέρχονται στο φαγητό μέσα από τα γεωργικά προϊόντα και το ρυπασμένο νερό. Η βιοεξυγίανση αποτελεί μια βιώσιμη και οικονομική τεχνολογία βασιζόμενη στην απομάκρυνση των ρυπαντών από το περιβάλλον με βιολογικούς τρόπους δηλαδή με την χρήση μικροοργανισμών. Στην παρούσα διπλωματική θα αναλυθεί συγκεκριμένα η βιοεξυγίανση του αντιμονίου (Sb) το οποίο ανήκει στην κατηγορία των βαρέων μετάλλων με την παρουσία βακτηρίων, καθώς επίσης θα γίνει αναφορά στα βακτηριακά στελέχη και στην μια κοινότητα τα οποία ήταν ικανά αφενός να αναπτυχθούν υπό την παρουσία του αντιμονίου και αφετέρου να μειώσουν την συνολική αρχική συγκέντρωση του αντιμονίου. Πιο συγκεκριμένα, 25 βακτηριακά στελέχη ανθεκτικά στο Sb(III), απομονώθηκαν από ρυπασμένο έδαφος προερχόμενο από πεδίο βολής της Ελβετίας. Ανάμεσα σε αυτά τα στελέχη και στη μια κοινότητα, τα 19 στελέχη ήταν ικανά να αναπτύσσονται σε θρεπτικό με την προσθήκη αντιμονίου ενώ ταυτοχρόνως βρέθηκαν 5 στελέχη τα B1_5, C1_6, B1_4, B1_7, C1_9, καθώς και η κοινότητα B2 τα οποία ήταν ικανά να οξειδώσουν το Sb(III) και να ελαττώσουν την συνολική συγκέντρωση του αντιμονίου. Πιο συγκεκριμένα μετά από τις πειραματικές διαδικασίες βρέθηκε ότι υπήρχε μείωση που έφτασε ως και 78% της αρχικής συγκέντρωσης. Ακόμα βρέθηκε ότι τα παραπάνω στελέχη και η κοινότητα B2 με την ποιοτική μέθοδο του υπερμαγγανικού καλίου ήταν ικανά να μετατρέπουν το τρισθενές αντιμόνιο σε πεντασθενές που είναι 10 φορές λιγότερο τοξικό σε σχέση με το τρισθενές. Επιπλέον, η συνεχιζόμενη έρευνα και οι μελλοντικές ανακαλύψεις για την ικανότητα των μικροοργανισμών να εξοικονομούν ενέργεια από τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής αντιμονίου και η απομόνωση νέων είδη αντιμονότροφων είναι απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση των μεταβολικών μονοπατιών των μικροοργανισμών αλλά και τους μηχανισμούς μείωσης του αντιμονίου.

Abstract

The existence of high concentrations of heavy metals in soil harms the environment but also human health, as a result of the food chain as well as the polluted water. Bioremediation is a sustainable and economic technology based on the removal of pollutants from the environment in biological ways which are the use of microorganisms. In the present diploma thesis, the bioremediation of antimony (Sb) which belongs to the category of heavy metals with the presence of bacteria will be specifically analyzed, as well as a reference will be made to the bacterial strains and a community that were able to grow in the presence of antimony and on the other hand to reduce the total initial concentration of antimony. More specifically, twenty-five bacterial strains resistant to Sb (III) were isolated from contaminated soil originating from a shooting range in Switzerland. Among these strains and in one community, nineteen strains were able to grow in nutrients with the addition of antimony while at the same time 5 strains B1_5, C1_6, B1_4, B1_7, C1_9, as well as the B2 community were found able to oxidize Sb (III) and reduce the total concentration of antimony. More specifically, after the experimental procedures, it was found that there was a reduction that reached up to 78% of the initial concentration. It was also found that the above strains and community B2 with the qualitative method of potassium permanganate were able to convert trivalent antimony into pentavalent which is 10 times less toxic than trivalent. In addition, continued research, and future discoveries on the ability of microorganisms to conserve energy from antimony redox reactions and the isolation of new species of antimonotrophs are necessary to better understand the metabolic pathways of microorganisms and the mechanisms of antimony reduction.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	4
Abstract	5
Κατάλογος εικόνων	7
Κατάλογος πινάκων	8
Κατάλογος διαγραμμάτων	8
Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή.....	11
Κεφάλαιο 2.....	11
2.1. Βιοτεχνολογία.....	11
2.2. Βιοεξυγίανση / βιοαποκατάσταση.....	11
2.3. Βιοδιαθεσιμότητα.....	12
2.4. Βιοσυσσώρευση / bioaccumulation.....	13
Κεφάλαιο 3. Αντιμόνιο – Sb.....	13
3.1. Χαρακτηριστικά αντιμονίου.....	13
3.1.2 Ανθρωπογενή αίτια ύπαρξης αντιμονίου (Sb)	17
3.1.3. Φυσικά αίτια ύπαρξης αντιμονίου (Sb).....	17
3.2. Χρησιμότητα αντιμονίου.....	18
3.3. Τοξικότητα και κινητικότητα του αντιμονίου	18
3.4. Βιοδιαθεσιμότητα αντιμονίου	19
3.5.1. Sb σε υδάτινα οικοσυστήματα.....	19
3.5.2 Sb στο έδαφος.....	20
3.6. Επιπτώσεις του αντιμονίου στον άνθρωπο.....	20
3.6.1. Μικρή ιστορική αναδρομή χρήσης αντιμονίου	22
Κεφάλαιο 4. Αντιμόνιο και pH	22
Κεφάλαιο 5. Μηχανισμοί αποκατάστασης από αντιμόνιο	25
5.1.Αντιμετώπιση της ρύπανσης από αντιμόνιο σε ένα υγρό περιβάλλον	25
5.2. Βιορόφηση/ρόφηση/προσρόφηση.....	25
5.2.1. Προσρόφηση από ανόργανους προσροφητές - προσρόφηση από οξείδια σιδήρου(Fe)	26
5.2.2. Προσρόφηση από οξείδια μαγγανίου(Mn)	26
5.3. Οξειδωση - Αναγωγή.....	28
5.3.1.Οξειδωτικά βακτήρια ικανά για τη βιοαποδόμηση Sb(III) σε Sb(V).....	30
5.3.2. Αναγωγή -μετατροπή του Sb(V) σε Sb (III).....	33
5.4. Φυτοαποκατάσταση/ Phytoremediation.....	35
Κεφάλαιο 6.....	37
6.1. Σκοπός	37
6.2. Υλικά και μέθοδοι.....	37

6.3. Προετοιμασία πειράματος	40
6.4. Απομόνωση βακτηριακών στελεχών.....	42
6.6. Αποτελέσματα	46
6.7. Συζήτηση.....	71
Κεφάλαιο 7. Βιβλιογραφία	76

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Το αντιμόνιο με την μορφή του στιμπνίτη ή αντιμονίτη Sb_2S_3 , την κυριότερη φυσική μορφή ύπαρξης του αντιμονίου στην φύση, και αποτελεί το κυρίαρχο ορυκτό μέταλλευμα του αντιμονίου.	13
Εικόνα 2 Το ορυχείο αντιμονίου Xikuangshan, στην Hunan, China (Faye Liu et al.,2010).	15
Εικόνα 3. Η παγκόσμια παραγωγή αντιμονίου μεταξύ του 2016-2020 (Yang Zhang et al.,2021).	16
Εικόνα 4. Champagne pool, σημαντικό γεωθερμικό φαινόμενο στην Νέα Ζηλανδία. Είναι υπερκορεσμένη με στιμπνίτη (Sb_2S_3) και orpiment (As_2S_3)	17
Εικόνα 5 Η κύρια πηγή ρύπανσης, η περιβαλλοντική διαδικασία και η οικολογική επίδραση του αντιμονίου στο περιβάλλον (Mengchang He et al., 2018).....	21
Εικόνα 6. Αλλαγές στις μορφές του αντιμονίου από την επίδραση του pH (Indika Herath et al., 2017).	22
Εικόνα 7.Οι κύριες μορφές του αντιμονίου σε διαφορετικές τιμές pH αλλά και δυναμικό οξειδοαναγωγής στους 18 °C(Yidan Zhang et al.,2022). Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
Εικόνα 8 ^A Βαλεντινίτης (Wikipedia) ΕΙΚΟΝΑ 8 ^B Στιβιοκλαουδίτης από το ορυχείο Tsumeb, περιοχή Oshikoto, Namibia (Gary Zito et al.,2009).	25
Εικόνα 9.Οι διάφορες μορφές διάλυσης του αντιμονίου (Indika Herath et al., 2017).....	27
Εικόνα 10. Μηχανισμοί αποκατάστασης αντιμονίου σε ένα υγρό περιβάλλον (Yang Zhang et al., 2021).	27
Εικόνα 11.Ένα μοντέλο βακτηριακού ενεργειακού μεταβολισμού σε απόκριση στο $Sb(III)$ στο <i>A. tumefaciens</i> GW4 (Jingxin Li et al.,2020).	29
Εικόνα 12(Φυλογενετικό δέντρο, βασισμένο στο 16 στο 16rna γονίδιο που δείχνει την γενετική σχέση του <i>Acinetobacter</i> στελέχους Jh7 με αναφορά άλλα βακτηριακά στελέχη. τα στελέχη με κόκκινο παρουσιάζουν τα βακτήρια που είναι ικανά να οξειδώνουν το $Sb(III) \rightarrow Sb(V)$, ενώ με μαύρο τα στελέχη βακτηρίων που είναι ικανά να μειώσουν το $Sb(V) \rightarrow Sb(III)$ (J.Gu et al.,2019).	34
Εικόνα 13. Οι οδοί μετασχηματισμού του αντιμονίου από τους μικροοργανισμούς(Christon J.Hurst, 2022).	35

Εικόνα 14 .Οι μηχανισμοί φυτοαποκατάστασης σε ένα έδαφος ρυπασμένο με αντιμόνιο (Yang Zhang et al.,2021).....	35
Εικόνα 15. Η μέθοδος της επίστρωσης σε στερεό θρεπτικό άγαρ.	42
Εικόνα 16.Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.....	43
Εικόνα 17. Στελέχη βακτηρίων σε γλυκερόλη.....	43
Εικόνα 18 α,Β Υγρή καλλιέργεια απομονωμένων στελεχών.....	44
Εικόνα 19 Το υπερμαγγανικό κάλιο (KMnO_4) αποθηκευμένο σε falcon των 15 ml.	45
Εικόνα 20 Διαδικασία απομόνωσης των στελεχών.....	45
Εικόνα 21 Κύτταρο C1 μετά από αραιώση 10^{-4}	45
Εικόνα 22.Αποικίες του κυττάρου C1_6, μετά από επίστρωση σε τρυβλίο με άγαρ.	46
Εικόνα 23.Ο κύκλος Α-αντιμόνιο στο έδαφος σε τράπεζα ανάδευσης.....	47
Εικόνα 24 Ποιοτικός έλεγχος της παρουσίας Sb(III) στην υγρή φάση της καλλιέργειας κατά την διάρκεια του πειράματος.	50
Εικόνα 25. Ποιοτικός έλεγχος της παρουσίας Sb(III) στην υγρή φάση της καλλιέργειας κατά την διάρκεια του πειράματος.	54
Εικόνα 26. Οι βέλτιστες τιμές pH, στις οποίες ενεργοποιούνται τα ένζυμα σε μια αντίδραση. (Δανάη Βενιέρη - Ανέστης Βλυσίδης, Μικροβιολογία, 2022).	73

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποδόμηση (Vidali et al., 2001).	12
Πίνακας 2.Τα πιο κοινά πρωτογενή ορυκτά αντιμονίου (Corby G.Anderson et al., 2012).	16
Πίνακας 3.Βακτήρια ικανά για οξείδωση του Sb(III), που έχουν μελετηθεί κατά καιρούς.....	32
Πίνακας 4.Χημικά υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των θρεπτικών.....	38
Πίνακας 5. Η τιμή του pH του κύκλου Α -αντιμόνιο στο χώμα.	46
Πίνακας 6. Τιμές pH από τον κύκλο Β, αβιοτικού και βιοτικού παράγοντα.....	47
Πίνακας 7. Οι κύκλοι των βακτηριακών στελεχών και της κοινότητας B2 που μελετήθηκαν σε διάστημα 1 χρόνου.	48
Πίνακας 8. Εμπλεκόμενα γονίδια στον μεταβολισμό του αντιμονίου (Christon J Hurst 2022) ...	73

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με την κοινότητα B2.....	49
Διάγραμμα 2. Η διακύμανση της τιμής του pH, όπως παρατηρήθηκε σε ένα κύκλο 7 ημερών με την κοινότητα B2. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).....	50
Διάγραμμα 3. Καμπύλη ανάπτυξης της κοινότητας B2 που απομονώθηκε από το δείγμα B, συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).	51
Διάγραμμα 4. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος C1_6. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση(n=3).....	52
Διάγραμμα 5. η διακύμανση της τιμής του pH, συναρτήσει του χρόνου με το στέλεχος C1_6. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).....	52
Διάγραμμα 6.Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους C1_6, που απομονώθηκε από το δείγμα C, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν το τυπικό σφάλμα	53
Διάγραμμα 7.Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος B1_5. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση(n=3).	55
Διάγραμμα 8. η διακύμανση της τιμής του pH, συναρτήσει του χρόνου με το στέλεχος B1_5. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση(n=3).....	56
Διάγραμμα 9.Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους B1_5, που απομονώθηκε από το δείγμα B, συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).	56
Διάγραμμα 10. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος B1_4, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).	57
Διάγραμμα 11. Διακύμανση της τιμής του pH, συναρτήσει του χρόνου με το στέλεχος B1_4. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση(n=3).....	58
Διάγραμμα 12. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους B1_4, που απομονώθηκε από το δείγμα B, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν το τυπικό σφάλμα	58
Διάγραμμα 13. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους B1_7, που απομονώθηκε από το δείγμα B, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση(n=2).	59
Διάγραμμα 14. Συγκέντρωση ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το βακτηριακό στέλεχος B1_7, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=2).....	60
Διάγραμμα 15.Διακύμανση της τιμής του pH, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν το τυπικό σφάλμα	61
Διάγραμμα 16. Η διακύμανση της τιμής του pH κατά την διάρκεια ενός 6ήμερου πειραματικού κύκλου με το στέλεχος B1_5. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).	62
Διάγραμμα 17. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος B1_5.	63
Διάγραμμα 18. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος C1_5, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).	64
Διάγραμμα 19. η διακύμανση της τιμής του pH σε έναν 6ήμερο πειραματικό κύκλο με το στέλεχος C1_5. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).....	65
Διάγραμμα 20. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος C1_9. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση(n=2).....	66
Διάγραμμα 21. Η διακύμανση της τιμής του pH, σε έναν 7ήμερο πειραματικό κύκλο με το στέλεχος C1_9.Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).....	67

Διάγραμμα 22. Διακύμανση τιμής pH, όπως παρατηρήθηκε σε έναν 6ήμερο πειραματικό κύκλο. Οι γραμμές σφάλματων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).	68
Διάγραμμα 23. Συγκέντρωση ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος C2_3, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n= 2).	69
Διάγραμμα 24. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους C2_3, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=2).	70

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

ΓΕΝΙΚΑ

Στις μέρες μας η ανθρώπινη δραστηριότητα αφήνει το στίγμα της όλο και εντονότερα στο περιβάλλον. Από το έδαφος και τα ύδατα που ρυπαίνουμε μέχρι και την ποιότητα του αέρα που υποβαθμίζεται καθημερινώς. Αυτό οφείλεται κυρίως στην βιομηχανική παραγωγή και τεχνολογία που αναπτύσσεται ταχύτατα. Παράλληλα η αύξηση του πληθυσμού καθιστά ακόμα δυσκολότερη τη διαχείριση του. Οι υπάρχουσες γνώσεις και μηχανισμοί αποκατάστασης είναι σε εξέλιξη και μελέτη, ώστε να γίνει η διαχείριση και η αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων περισσότερο αποτελεσματική. Επιπλέον, η ανάγκη ύπαρξης τεχνολογιών αποκατάστασης που σέβονται το περιβάλλον αλλά είναι και οικονομικοί γίνεται όλο και εντονότερη. Ένα παράδειγμα τέτοιας τεχνολογίας αποτελεί η βιοεξυγίανση, η οποία θα αναλυθεί περισσότερο ως έννοια παρακάτω. Η παρούσα διπλωματική στηρίζεται στην πειραματική εκπόνηση της τεχνολογίας της βιοεξυγίανσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Με την έννοια της βιοτεχνολογίας, ορίζεται η τεχνολογία των βιολογικών διεργασιών με την χρήση οργανισμών αλλά κυρίως μικροοργανισμών, μερών και προϊόντων επεξεργασιών τους, όπως ένζυμα, δευτερογενείς μεταβολίτες και αντισώματα για την παραγωγή χρήσιμων ή εμπορικά αξιοποιήσιμων προϊόντων για την παροχή υπηρεσιών προς όφελος του ανθρώπου (Julia Kagan, 2022). Επιπλέον, η επιταχυνόμενη ανάπτυξη στον τομέα της βιοτεχνολογίας, ήρθε τον 19^ο αιώνα με την ανακάλυψη των μικροοργανισμών, την μελέτη της γενετικής από τον Gregor Mendel, και την μελέτη της σημαντικότητας της ζύμωσης και των μικροβιακών διεργασιών από τους Pasteur και Lister. Από τις αρχές του 20^ο αιώνα, η ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming, οδήγησε σε μεγάλη παραγωγή την δεκαετία του 1940, (Julia Kagan, 2022). Πλέον θεωρείται μια διακλαδική επιστήμη. Το 1981 η Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία Βιοτεχνολογίας (European Federation of Biotechnology) όρισε την Βιοτεχνολογία ως <<την ολοκληρωμένη χρήση της Βιοχημείας, της Μικροβιολογίας και της Χημικής Μηχανικής για την τεχνολογική εφαρμογή των δυνατοτήτων των μικροβίων και των καλλιεργειών κυττάρων προερχόμενων από ιστούς >>.

2.2. Βιοεξυγίανση / βιοαποκατάσταση

Η βιοεξυγίανση ορίζεται ως η διαδικασία κατά την οποία τα οργανικά και τα ανόργανα απόβλητα υποβάλλονται σε βιολογική αποδόμηση υπό ελεγχόμενες συνθήκες ώστε να μετατραπούν σε μία αβλαβή κατάσταση ή σε επίπεδα κάτω από όρια συγκέντρωσης που έχουν

καθορίζεται από τις ρυθμιστικές αρχές. Εξ ορισμού, η βιοαποκατάσταση είναι η χρήση των ζώντων οργανισμών κυρίως μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, και άλγη για την αποδόμηση των περιβαλλοντικών ρύπων σε λιγότερο τοξικές μορφές αλλά και την γενικότερη απομάκρυνση ενός ρυπαντή από την βιόσφαιρα. Αποτελεί μια βιολογική διεργασία. Επιπλέον, η χρήση των βακτηρίων στην βιοεξυγίανση των βαρέων μετάλλων αλλά και γενικότερα στην βιοτεχνολογία θεωρείται η περισσότερη διαδεδομένη ίσως και η σημαντικότερη κατηγορία, αφού χρησιμοποιούνται για πάρα πολλές και ετερογενείς φύσεως διεργασίες. Πιο αναλυτικά, τα βακτήρια ανήκουν στην κατηγορία των προκαρυωτικών κυττάρων. Τα προκαρυωτικά κύτταρα έχουν τυπικό μέγεθος 0,5 έως 3 μm .

Τα προκαρυωτικά κύτταρα είναι ιδιαίτερα προσαρμοστικά και πολυποίκιλα, κάτι απαραίτητο για την επιβίωση τους λόγω του μικρού τους μεγέθους (Λυμπεράτος, 1998). Αυτό τα καθιστά προτιμητέα όσον αφορά την επιλογή τους για την βιοτεχνολογία, καθώς διαθέτουν αρκετούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε πολύ ακραίες συνθήκες και περιβάλλοντα.

Η βιοαποκατάσταση αποτελεί μια τεχνολογία η οποία με την χρήση μικροοργανισμών, ενζύμων και φυτών έχει την δυνατότητα καταστροφής επιβλαβών ουσιών. Είναι μια τεχνική που αφαιρεί βιοαποδομήσιμες σύνθετες τοξικές ουσίες σε αβλαβή και αποδεκτά τελικά προϊόντα, π.χ. CO_2 και H_2O μέσω των κυτταρικών μεταβολισμών (Vidali et al., 2001).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποδόμηση (Vidali et al., 2001).

Parameters	Condition required for microbial activity	Optimum value for an oil degradation
Soil moisture	25–28% of water holding capacity	30–90%
Soil pH	5.5–8.8	6.5–8.0
Oxygen content	Aerobic, minimum air-filled pore space of 10%	10–40%
Nutrient content	N and p for microbial growth	C:N:P = 100:10:1
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	15–45	20–30
Contaminants	Not too toxic	Hydrocarbon 5–10% of dry weight of soil
Heavy metals	Total content 2000 ppm	700 ppm
Type of soil	Low clay or silt content	

2.3. Βιοδιαθεσιμότητα

Ένας επίσης ασαφής όρος που δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια είναι και αυτός της βιοδιαθεσιμότητας. Ένα θρεπτικό ή τοξικό στοιχείο καλείται βιοδιαθέσιμο, εάν είναι σε τέτοια χημική μορφή, ώστε να είναι δυνατό να απορροφηθεί εύκολα από τα φυτά και να επηρεάσει τον κύκλο ζωής. Ο ορισμός αυτός δεν περιορίζεται στην περίπτωση των φυτών, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τους ανθρώπους και άλλους οργανισμούς. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, η βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων μπορεί να είναι επιθυμητή ή επιβλαβής για τα φυτά ή τους ζωικούς οργανισμούς, ανάλογα με το αν η πρόσληψη αφορά θρεπτικά ή επιβλαβή συστατικά (Roberts, 2005). Παρά την αβεβαιότητα που συνδέεται με τον όρο, υπάρχει μια γενική συναίνεση ότι η μορφή του μετάλλου συσχετίζεται με τη βιοδιαθεσιμότητα του. Αν και γενικά η βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων συνδέεται με την ικανότητα τους να διαπερνούν τις μεμβράνες των κυττάρων δεν σημαίνει ότι όλοι οι οργανισμοί θα τους προσλάβουν ή σε

περίπτωση που το κάνουν θα μπορούν και να τους αποβάλλουν. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι τα βακτήρια και οι μύκητες των εδαφών μπορούν να ανεχθούν υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων, μέσω διάφορων μηχανισμών (δέσμευση των μετάλλων με πρωτεΐνες, σχηματισμός αδιάλυτων μεταλλικών σουλφιδίων κ.α.).

2.4. Βιοσυσσώρευση / bioaccumulation

Με τον όρο της βιοσυσσώρευσης, εννοείται το φαινόμενο κατά το οποίο αυξάνεται στους ιστούς των οργανισμών η συγκέντρωση χημικών ουσιών που δεν μπορούν να μεταβολιστούν από τη βάση της τροφικής αλυσίδας μέχρι και την κορυφή της. Αν οι ουσίες που συσσωρεύονται είναι επιβλαβείς, αποτελούν τεράστιο πρόβλημα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Επίσης από τον οργανισμό προστασίας περιβάλλοντος των Η.Π.Α έχει οριστεί ο παράγοντας βιοσυσσώρευσης (BAF) ως η αναλογία του μολυντικού παράγοντα σε ένα οργανισμό προς την συγκέντρωσή του σε ένα περιβάλλον ατμόσφαιρας σε σταθερή κατάσταση, όπου ο οργανισμός μπορεί να προσλάβει τον ρύπο μέσω της κατάποσης με την τροφή του καθώς και μέσω του άμεσου περιεχομένου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αντιμόνιο – Sb



ΕΙΚΟΝΑ 1. Το αντιμόνιο με την μορφή του στιμπνίτη ή αντιμονίτη Sb_2S_3 , την κυριότερη φυσική μορφή ύπαρξης του αντιμονίου στην φύση, και αποτελεί το κυρίαρχο ορυκτό μέταλλευμα του αντιμονίου.

3.1. Χαρακτηριστικά αντιμονίου

Το αντιμόνιο (Sb), είναι ένα πολuasθενές μεταλλοειδές με ατομικό αριθμό 51, ατομικό βάρος 122 πυκνότητα 6.697 kg/m^3 στους 26°C (Anderson, 2012), το οποίο ανήκει στον τομέα p του περιοδικού πίνακα, και πιο συγκεκριμένα ανήκει στα μεταλλοειδή. Σε αυτήν την κατηγορία τα

στοιχεία έχουν γνωρίσματα και από τα δύο είδη συμπεριφοράς (μέταλλα και αμέταλλα). Το αντιμόνιο είναι ένα φυσικό στοιχείο στον φλοιό της Γης και βρίσκεται συνήθως με την μορφή του σπιμπνίτη Sb_2S_3 , στα ορυχεία. Έρευνες έχουν δείξει ότι το ανόργανο αντιμόνιο είναι πιο επιβλαβές σε σχέση με το οργανικό (YanMing Zhu et al., 2020). Επιπλέον, το αντιμόνιο υπάρχει σε μια πληθώρα σθένους της οξειδωτικής κατάστασης (-III, 0, III, V). Βρίσκεται κυρίως στις καταστάσεις οξείδωσης III και V σε περιβαλλοντικά, βιολογικά και γεωχημικά συστήματα και το στοιχείο αντιμόνιο δεν θεωρείται απαραίτητο για τα φυτά ή τα ζώα (Filella et al., 2007). Ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να θεραπεύσει κάποιες ασθένειες, όπως η σχιστοσωμίαση και η λεϊσμανίαση. Φυσικά αίτια παρουσίας του αντιμονίου είναι από ηφαιστειακές εκρήξεις, δασικές φωτιές, αεραγωγοί βαθιάς θάλασσας. Από την άλλη πλευρά πλήθος ανθρωπογενών δραστηριοτήτων ευθύνεται για την ταχύτατη ρύπανση του περιβάλλοντος από αντιμόνιο κυρίως οι εξορύξεις και οι πρακτικές τήξης καθώς και τα εργοστάσια παραγωγής μετάλλων, το βάψιμο για την επικάλυψη βιομηχανιών και τα βυρσοδεψεία. Η ετήσια παραγωγή του αντιμονίου, -το οποίο είναι το 9ο στοιχείο που εξορύσσεται περισσότερο- ανέρχεται περίπου στους 140.000 τόνους, οι οποίοι εξορύσσονται και παρέχονται σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς (Filella et al., 2002, Shan et al., 2014, Li J. et al., 2018).

Το αντιμόνιο για το λόγο ότι βρίσκεται στην ομάδα 15 του περιοδικού πίνακα, ακριβώς κάτω από το Αρσενικό (As), έχει πολλά όμοια χημικά και τοξικολογικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, κανένα από τα δυο αυτά στοιχεία δεν είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο. Θεωρούνται και τα δύο ως ρύποι προτεραιότητας από την υπηρεσία προστασίας περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA). Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (ΠΟΥ) έχει καθιερώσει ότι η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του Sb στο έδαφος είναι $36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ και στο πόσιμο νερό $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (WHO, 2003). Σύμφωνα με το παραπάνω πρότυπο, η ρύπανση από αντιμόνιο είναι αρκετά σοβαρή στην Κίνα, ειδικά στην περιοχή του μεγαλύτερου ορυχείου αντιμονίου στο κόσμο (Xikuangshan), στην επαρχία Hunan (Liu et al., 2010). Επιπλέον, η Ασία και η Ευρώπη είναι οι 2 μεγαλύτερες πηγές αντιμονίου, που αντιπροσωπεύουν το 57% και το 24 % αντίστοιχα της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής αέριων εκπομπών. Οι περιοχές με το υψηλότερο ποσοστό εκπομπών αντιμονίου είναι στην δυτική Ευρώπη και την νοτιοανατολική Ασία.

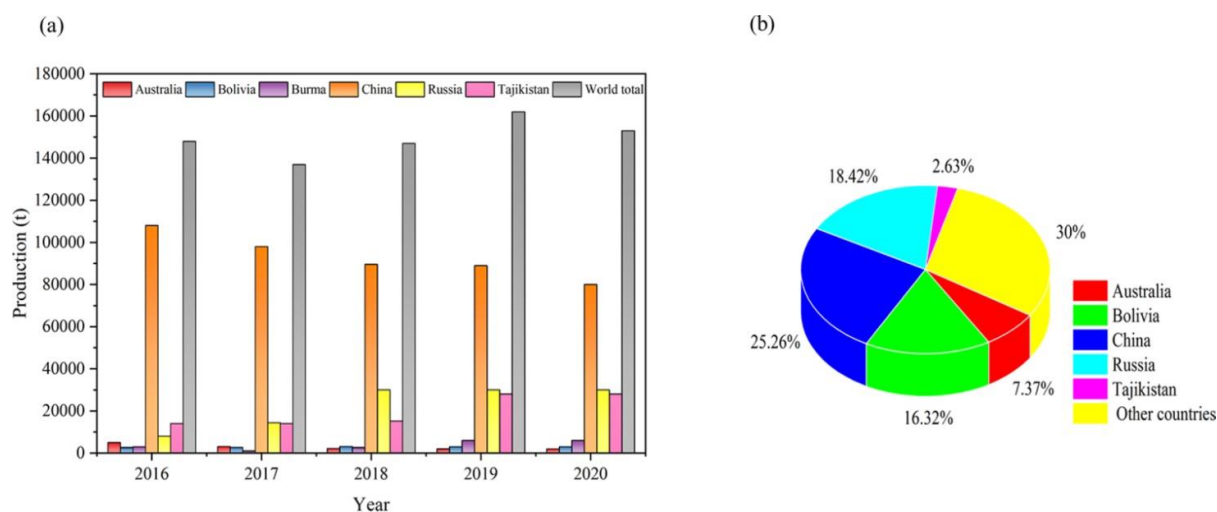


ΕΙΚΟΝΑ 2 Το ορυχείο αντιμονίου Xikuangshan, στην Hunan, China (Faye Liu et al.,2010).

Επιπλέον, το αντιμόνιο είναι ένα χαλκόφιλο στοιχείο σύμφωνα με την κλασσική ταξινόμηση του Goldschmidt (Filella et al.,2002). Αυτό σημαίνει ότι εμφανίζεται κυρίως στην φύση ως στιμπνίτης και βαλεντινίτης(εικόνα 8^α). Ακόμα, ως χαλκόφιλο στοιχείο συχνά εμφανίζεται με το θείο όπως και με τα βαρέα μέταλλα, τον μόλυβδο, χαλκό και τον άργυρο (Christopher A. Abin et al., 2014).

Υπάρχουν περισσότερα από 120 είδη ορυκτών στο φυσικό περιβάλλον όπως φαίνεται και από τον πίνακα 2 παρακάτω. Τα ορυκτά κυρίως βρίσκονται με τη μορφή στιβνίτη (Sb_2S_3), μεταλλεύματος αντιμονίου (Sb_2O_3), λευκού αντιμονίου (Sb_2O_4), θείου, υδραργύρου αντιμονίου (HgS_2 , Sb_2S_3), τζαμεσονίτη ($Pb_2Sb_2S_5$), τετραεδρίτη ($Cu_8Sb_2S_7$) και άλλα ορυκτά. Ταυτόχρονα, μπορεί επίσης να υπάρχει με τη μορφή φυσικού αντιμονίου, διαμεταλλικής ένωσης, πυριτικού, αντιμονικού και αλογονιδίων. Αυτό αντανακλά την ποικιλομορφία των χημικών ιδιοτήτων του αντιμονίου (Wu et al., 2008, Zhu et al., 2010).

Το αντιμόνιο σπάνια βρίσκεται στη φύση ως αυτοφυές μέταλλο λόγω της ισχυρής του συγγένειας με το θείο και μέταλλα όπως ο χαλκός, ο μόλυβδος και ο άργυρος. Στην πραγματικότητα, η λέξη αντιμόνιο (από τον συνδυασμό των λέξεων αντί μόνος) σημαίνει «ένα μέταλλο που δεν βρίσκεται μόνο του». Το μεταλλικό αντιμόνιο είναι πολύ εύθραυστο για να χρησιμοποιηθεί μόνο του και στις περισσότερες περιπτώσεις πρέπει να ενσωματωθεί σε κράμα ή ένωση.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Η παγκόσμια παραγωγή αντιμονίου μεταξύ του 2016-2020 (Yang Zhang et al., 2021).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Τα πιο κοινά πρωτογενή ορυκτά αντιμονίου (Corby G. Anderson et al., 2012).

Horsfordite Cu_6Sb	Dyscrasite Ag_3Sb	Stibiodomeykite $\text{Cu}_3(\text{As}, \text{Sb})$
Aurostibite AuSb_2	Breithauptite NiSb	Breithauptite NiSb
Ullmannite NiSbS	Gudmundite FeSbS	Stibnite Sb_2S_3
Stibiobismuthine $(\text{Bi}, \text{Sb})_4\text{S}_7$	Tetrahedrite $\text{Cu}_{12}\text{Sb}_4\text{S}_{13}$	Annivite $\text{Cu}_{12}(\text{Sb}, \text{Bi}, \text{As})_4\text{S}_{13}$
Freibergite $(\text{Cu}, \text{Ag})_{12}\text{Sb}_4\text{S}_{13}$	Bournonite PbCuSbS_3	Stephanite Ag_5SbS_4
Ramdohrte $\text{Ag}_2\text{Pb}_3\text{Sb}_3\text{S}_9$	Andorite $\text{AgPbSb}_3\text{S}_6$	Geocronite $\text{Pb}_5(\text{As}, \text{Sb})_{12}\text{S}_8$
Zinckenite PbSb_2S_4	Jamesonite, $\text{Pb}_4\text{FeSb}_6\text{S}_{14}$	Boulangerite $\text{Pb}_5\text{Sb}_4\text{S}_{11}$
Falkmanite $\text{Pb}_3\text{Sb}_2\text{S}_6$	Meneghinite $\text{Pb}_4\text{Sb}_2\text{S}_7$	Cylindrite $\text{Pb}_3\text{Sn}_4\text{Sb}_2\text{S}_{14}$
Franckeite $\text{Pb}_5\text{Sn}_3\text{Sb}_2\text{S}_{14}$	Livingstonite HgSb_4S_7	Berthierite FeSb_2S_4
Famatinite Cu_3SbS_4	Stibioluzonite $\text{Cu}_3(\text{Sb}, \text{As})\text{S}_4$	Bournonite PbCuSbS_3
Stibioenargite $\text{Cu}_3(\text{As}, \text{Sb})_4$	Gerstleyite $\text{Na}_2(\text{Sb}, \text{As})_8\text{S}_{13} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kermesite $\text{Sb}_2\text{S}_2\text{O}$
Gabrielite $\text{Ti}_6\text{Ag}_3\text{Cu}_6(\text{As}, \text{Sb})_9\text{S}_{21}$	Stibiocolumbite $\text{Sb}(\text{Nb}, \text{Ta})\text{O}_4$	Senarmontite Sb_2O_3
Romeite $5\text{CaO}_3 \cdot \text{Sb}_2\text{O}_5$	Stibiconite $\text{Sb}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Stenhuggarite $\text{CaFeSbAs}_2\text{O}_7$
Cervantite Sb_2O_4	Stibio-tellurobismutite $(\text{Bi}, \text{Sb})_2\text{Te}_3$	Valentinite Sb_2O_3

3.1.2 Ανθρωπογενή αίτια ύπαρξης αντιμονίου (Sb)

Εργασίες εξόρυξης και τήξης, η καύση άνθρακα και πετρελαίου και τα χρησιμοποιημένα πυρομαχικά σχετίζονται με υψηλές συγκεντρώσεις Sb στο περιβάλλον, για παράδειγμα εγκαταλελειμμένα και ενεργά ορυχεία Sb, εγκαταστάσεις επεξεργασίας ορυκτών και μεταλλουργεία, αποτεφρωτήρες απορριμμάτων, σταθμοί παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας βιομηχανίες εστεροποίησης τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET), εργοστάσια μπαταριών, σκοπευτήρια και αυτοκινητόδρομοι (Okkenhaug et al., 2011, Reimann et al., 2010).

Οι ενώσεις του αντιμονίου απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα σε μορφή οξειδίων από την αποτέφρωση απορριμμάτων, καύση ορυκτών καυσίμων και κατά την τήξη μετάλλων. Άλλες πηγές ρύπανσης περιλαμβάνουν την οδική κυκλοφορία (σκόνη από τα τακάκια φρένων και τα ελαστικά) (Olevon Uexküll et al., 2005), τα πεδία βολής (αντιμόνιο στα πυρομαχικά) (Nanthi Bolan et al., 2022).

3.1.3. Φυσικά αίτια ύπαρξης αντιμονίου (Sb)

Το αντιμόνιο πέρα από τις ανθρωπογενείς αιτίες ύπαρξης μπορεί να υπάρχει στο περιβάλλον από φυσικά αίτια. Η ηφαιστειακή και η βιολογική δραστηριότητα όπως και η διάβρωση πετρωμάτων που περιέχουν αντιμόνιο αποτελούν κάποιες από τις φυσικές πηγές ύπαρξης αντιμονίου στο περιβάλλον (Mengchang He et al., 2019). Οι Hinkley et al. (1999), ανέφεραν ότι περίπου 5 τόνοι αντιμονίου τον χρόνο απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα από τα ηφαίστεια, συνεισφέροντας στην ρύπανση του αντιμονίου στην ατμόσφαιρα.

Το αντιμόνιο (Sb) είναι ευρέως παρόν στη λιθόσφαιρα, την υδρόσφαιρα και τη βιόσφαιρα ως ιχνοστοιχείο σε μικρή ποσότητα (Renjian Deng et al., 2021). Ως ιχνοστοιχείο στην γεωχημεία χαρακτηρίζεται όταν η συγκέντρωση του είναι μικρότερη από 1000 ppm ή αποτελεί το 0,1% της σύνθεσης του ενός βράχου.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Champagne pool, σημαντικό γεωθερμικό φαινόμενο στην Νέα Ζηλανδία. Είναι υπερκορεσμένη με στιμπνίτη (Sb_2S_3) και orpiment (As_2S_3).

3.2. Χρησιμότητα αντιμονίου

Η πιο σημαντική χρήση του μετάλλου αντιμονίου είναι ως σκληρυντικό σε μόλυβδο για μπαταρίες αποθήκευσης. Το μέταλλο βρίσκει επίσης εφαρμογές σε κολλήσεις και άλλα κράματα. Αντιθέτως το τρισθενές ιόν αντιμονίου Sb(III) , παρουσιάζει ένα μεγάλο εύρος στην χρησιμότητα του, το οποίο αυτή τη στιγμή είναι τέτοιο, που θεωρείται στοιχείο κλειδί στη βιομηχανία ηλεκτρονικών και μηχανολογίας (Nguyen et al., 2018). Χρησιμοποιείται σε επιβραδυντικά φλόγας σε λευκά ηλεκτρονικά περιβλήματα καθώς και χριστουγεννιάτικα στολίδια, μπλοκ Lego, πλαστικά έπιπλα κήπου, χρωστικές, γυάλινα σκεύη, κεραμικά και σε κράματα, τα οποία χρησιμοποιούνται καθημερινά σε ανθρώπινες δραστηριότητες (Qi et al., 2008). Ορισμένα από τα συγκεκριμένα προϊόντα περιέχουν παραπάνω από 1000 $\mu\text{g/g}$ Sb. Το αντιμόνιο έχει δημιουργήσει ένα παγκόσμιο δίλημμα, λόγω των πολυφασματικών χρήσεων του αλλά και της τοξικότητας του (Herath et al., 2017). Η αύξηση της παραγωγής Sb μαζί με την μη επαρκή αποκατάσταση έχει επιταχύνει την ρύπανση του Sb σε εδάφη και νερά.

Επιπλέον, το PET (τερεφθαλικός πολυαιθυλεστέρας) είναι ένα θερμικό και φυσικά σταθερό, ανακυκλώσιμο υλικό με χαμηλή πυκνότητα, που χρησιμοποιείται σε συσκευασίες τροφίμων και ποτών. Το τριοξείδιο του αντιμονίου χρησιμοποιείται συχνά ως καταλύτης πολυσυμπύκνωσης στην παραγωγή PET (MarcBiver et al., 2021). Η χρήση αυτού του καταλύτη μπορεί να οδηγήσει σε υπολειμματικές περιεκτικότητες Sb (100 έως 300 mg/kg). Όταν τα πλαστικά μπουκάλια PET με πόσιμο νερό αποθηκεύονται σε υψηλές θερμοκρασίες (40 °C), πχ σε φορτηγά το καλοκαίρι η συγκέντρωση του αντιμονίου στο νερό αυξάνεται σημαντικά παρά τα χαμηλά επίπεδα του αντιμονίου ($142.71 \pm 29.81 \mu\text{g/g}$) στο υλικό συσκευασίας (Carneado et al., 2015, Qiao et al., 2018).

3.3. Τοξικότητα και κινητικότητα του αντιμονίου

Η τοξικότητα και η κινητικότητα του Sb εξαρτώνται από το χημικό του είδος στο περιβάλλον, το οποίο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κατάσταση οξείδωσής του (Shtangeeva et al., 2012). Το στοιχειακό Sb είναι πιο τοξικό από τα άλατα του και τα ανόργανα είδη (Sb(OH)_6 , Sb(OH)_3) του αντιμονίου είναι πιο τοξικά από τα οργανικά. Οι Filella et al. (2007) και Smichowski (2008), έδειξαν ότι η τοξικότητα του Sb (III) είναι 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή του Sb (V). Επιπλέον, η τοξικότητα του ανόργανου αντιμονίου είναι μεγαλύτερη από αυτή του οργανικού (Obiakor et al., 2018). Ο μηχανισμός με τον οποίο λειτουργεί η τοξικότητά του αντιμονίου σχετίζεται με την ικανότητα του να συγγενεύει με την πρωτεΐνη της ομάδας mercapto(-SH). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας, την διατάραξη της ισορροπίας των ιόντων των κυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή της καρδιάς, των πνευμόνων αλλά και των υπόλοιπων οργάνων (Li et al., 2016). Η διαλυτότητα, η κινητικότητα και η τοξικότητα του αντιμονίου στο περιβάλλον επηρεάζεται αρκετά από την συμπλοκοποίηση του από ανόργανους και οργανικούς συνδέτες, την προσρόφηση του σε οργανική ύλη και σε επιφάνεια ορυκτών, και στην κατακρήμνιση του. Τα αναφερόμενα παραπάνω εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το pH και την κατάσταση οξείδωσης του αντιμονίου Sb (Kong et al., 2015, Wilson et al., 2014). Γενικότερα, ένας κανόνας που έχει καθιερωθεί για την τοξικότητα των ειδών του αντιμονίου είναι ο εξής:

Από το λιγότερο στο περισσότερο τοξικό είδος αντιμονίου

Οργανικά αντιμονικά (για παράδειγμα μεθυλιωμένα είδη αντιμονίου) < Sb(V) < Sb(III)

(Gebel et al., 1997, Krachler et al., 2001).

Το Sb που εκπέμπεται στο περιβάλλον απορροφάται και μπορεί να υφίσταται αντιδράσεις οξειδοαναγωγής σε ανόργανα ή οργανικά περιβαλλοντικά μέσα, αλλάζοντας την υπάρχουσα μορφή του και ασκώντας τοξικές επιδράσεις στο οικοσύστημα.

3.4. Βιοδιαθεσιμότητα αντιμονίου

Η διαθεσιμότητα του αντιμονίου στο έδαφος επηρεάζεται αρκετά από το pH του χώματος. Από έρευνες που έχουν γίνει για την σχέση μεταξύ της διαθεσιμότητας του Sb και των φυτών, έδειξαν το φυτό αμάρανθος (*Amaranthus tricolor* Linn.) μπορούσε να απορροφήσει και να μετατοπίσει περισσότερο Sb σε έδαφος με αλκαλικό pH (8.39) από ότι σε ένα έδαφος με όξινο pH (4.91) (QianyunZhong et al., 2020). Επιπλέον, άλλη έρευνα έχει δείξει ότι η βιοδιαθεσιμότητα του Sb επηρεάζεται θετικά σε ένα εύρος pH από 5.19- 7.78. Οι Hammel et al. (2002), έδειξαν ότι η βιοδιαθεσιμότητα μειώνεται αρκετά όταν μειώνεται και το pH. Η πλημμύρα τείνει να αλλάζει το pH σε ουδέτερη κατάσταση (Fageria et al., 2011). Για παράδειγμα οι παρατεταμένες πλημμύρες σε όξινο έδαφος θα αυξήσουν το pH ενώ σε ένα αλκαλικό έδαφος θα το μειώσουν, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο και τη βιοδιαθεσιμότητα του Sb.

3.5.1. Sb σε υδάτινα οικοσυστήματα

Το αντιμόνιο σε υδάτινα οικοσυστήματα υπάρχει υπό το σθένος Sb(III) και Sb(V). Το Sb(III) είναι πιο τοξικό (Wanh et al., 2011, Cornelis et al., 2005) και λιγότερο κινητό σε σχέση με το Sb(V) (Leuz et al., 2006) ενώ η υδατική μορφή του πεντασθενές αντιμονίου είναι πολύ πιο διαλυτή στο νερό. Επιπλέον, το ανόργανο antimony potassium tartrate είναι πολύ διαλυτό στο νερό (83 mg/L.) Μετά από έρευνες έχει βρεθεί ότι οι συγκεντρώσεις του αντιμονίου είναι υψηλότερες σε περιοχές που υπάρχει έλλειψη Fe(III) και χαμηλότερες όπου η αναγωγή του SO_4^{2-} ρυθμίζει τις συνθήκες οξειδοαναγωγής (Willis et al., 2014).

Το Sb(V) σε ένα περιβάλλον που η τιμή του pH είναι ουδέτερη (7) επικρατεί με την μορφή $\text{Sb}(\text{OH})_6$ υπό συνθήκες παρουσίας οξυγόνου, ενώ το Sb(III) είναι πιο διαδεδομένο ως $\text{Sb}(\text{OH})_3$ όταν υπάρχει έλλειψη οξυγόνου. Όμως από έρευνα των (Filella et al., 2002) βρέθηκε επίσης, ότι τόσο το Sb (III) και το Sb (V), μπορούν να ανιχνευθούν ταυτόχρονα σε διαφορετικές αναλογίες τόσο σε οξικό όσο και σε ανοξικό περιβάλλον. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι από μία έρευνα των Sun et al. (2019) βρέθηκε ότι το αντιμόνιο είναι πιο κινητό και βιοδιαθέσιμο κατά την διάρκεια συνθηκών πλημμύρας παρά σε καταστάσεις που επικρατεί ξηρασία.

3.5.2 Sb στο έδαφος

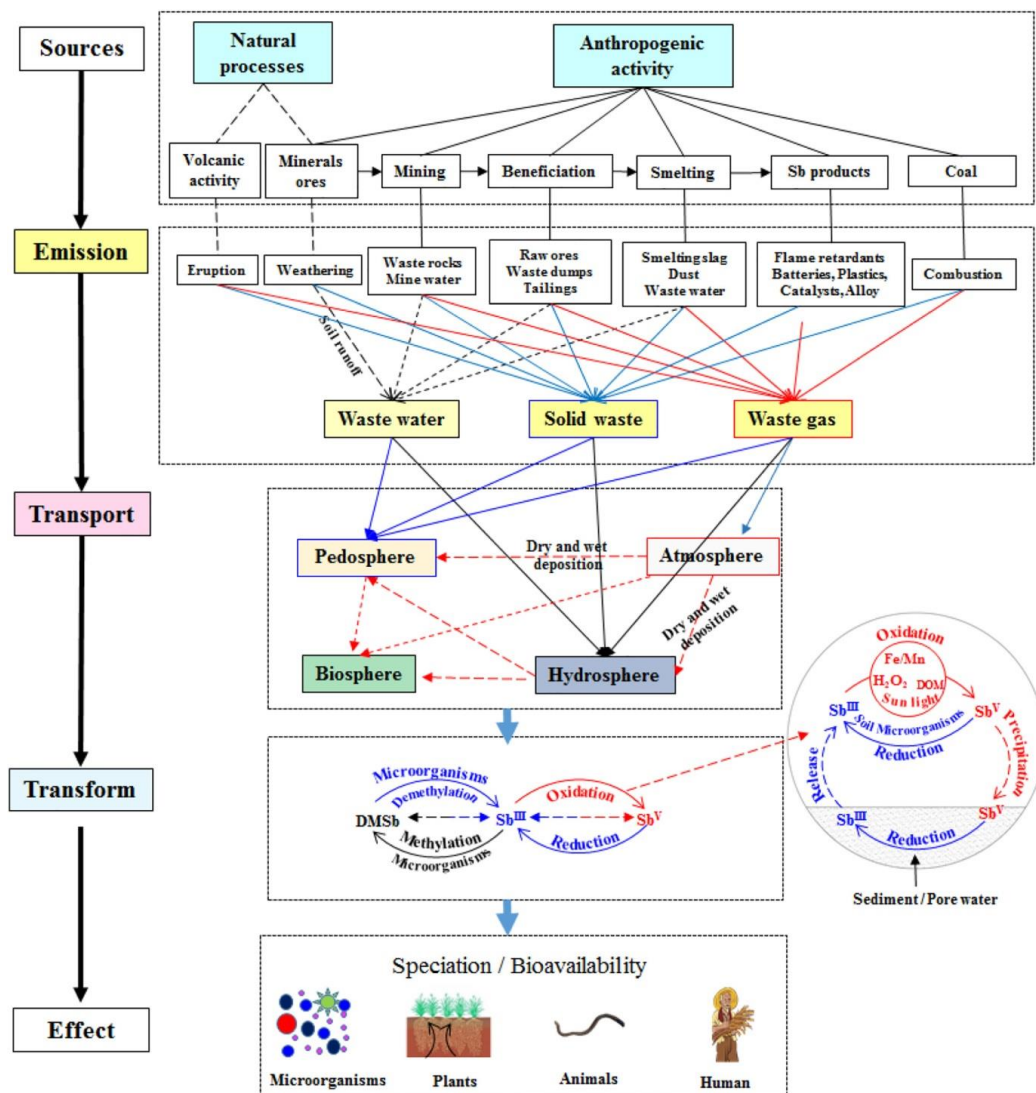
Τα πεδία βολής ρυπαίνονται από αντιμόνιο, το οποίο αντιπροσωπεύει το 2-8 % της σύνθεσης των σφαιρών μολύβδου (Lewis et al., 2010). Σε 4 χρόνια μελέτης βρέθηκε ότι η συγκέντρωση αντιμονίου στο νερό, το οποίο βρισκόταν στους πόρους του εδάφους σε ένα πεδίο βολής βρέθηκε να είναι της τάξης των 19-349 µg/L (Okkenhaug et al., 2016). Το αντιμόνιο στο έδαφος υπάρχει στην μορφή Sb(III) και Sb(V). Ακόμα έχουν βρεθεί και μεθυλιωμένα είδη αντιμονίου σε εδάφη (Duester et al., 2005), το οποίο θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα βιομεθυλίωσης από μικροοργανισμούς, πχ από νηματώδεις μύκητες *Scopulariopsis brevicaulis* (Andrewes et al., 2000). Επιπλέον, οι αεραγωγοί των ηφαιστειών είναι μια κύρια φυσική πηγή αντιμονίου. Το αντιμόνιο μπορεί να βρεθεί στα εδάφη και με την μορφή θειούχων χαμηλής διαλυτότητας. Παράλληλα συνδέεται εύκολα με οξείδια Fe, Al ή με οργανική ύλη στα εδάφη γεγονός που μειώνει την ικανότητα μετανάστευσης (Mengchang He et al., 2018).

3.6. Επιπτώσεις του αντιμονίου στον άνθρωπο

Επιπτώσεις του αντιμονίου στην υγεία του ανθρώπου μετά από μικρής διάρκειας έκθεσης είναι ο ερεθισμός στους πνεύμονες, στα μάτια και στο δέρμα ενώ η μακράς διάρκειας έκθεση έχει συσχετιστεί με πνευμονικές, καρδιαγγειακές, αναπνευστικές και ηπατικές παθήσεις όπως και γαστρεντερικά προβλήματα. Το αντιμόνιο μπορεί να μπερδέψει τα κύτταρα, επιφέροντας αλλαγές στο DNA και εντέλει να προκαλέσει καρκίνο (Cooper et al., 2009).

Όπως και το αρσενικό, η ρύπανση του αντιμονίου απειλεί την ανθρώπινη υγεία λόγω της τοξικότητας και βιοδιαθεσιμότητας του. Μπορεί να προκαλέσει οξεία και χρόνια τοξικότητα με αρκετούς μηχανισμούς όπως η ενδοκυτταρική οξείδωση και παρεμβολή της διαδικασίας επιδιόρθωσης του DNA (De Boeck et al., 2003, Harvey and Leinwand, 2011). Οι τρόποι προσρόφησης του αντιμονίου στον άνθρωπο ποικίλουν από εισπνοή σκόνης, δερματική απορρόφηση και κατάποση (Paerke et al., 2014).

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η κύρια πηγή ρύπανσης, η περιβαλλοντική διαδικασία και η οικολογική επίδραση του αντιμονίου στο περιβάλλον.



ΕΙΚΟΝΑ 5 Η κύρια πηγή ρύπανσης, η περιβαλλοντική διαδικασία και η οικολογική επίδραση του αντιμονίου στο περιβάλλον (Mengchang He et al., 2018).

Στην παραπάνω εικόνα αριστερά παρουσιάζεται η τύχη του αντιμονίου από την πηγή, στην εκπομπή, μεταφορά, μετασχηματισμό του με τελικό βήμα την επίδραση του. Ενώ δεξιά πάνω απεικονίζονται τα μονοπάτια από φυσικά και ανθρωπογενή αίτια, στην υδατική φάση μετέπειτα στην βιόσφαιρα/ υδρόσφαιρα/ pedosphere(έδαφος)/ ατμόσφαιρα και στους μηχανισμούς μετατροπής που κάνουν το αντιμόνιο βιοδιαθέσιμο στους οργανισμούς και στο περιβάλλον (Mengchang He et al., 2018).

3.6.1. Μικρή ιστορική αναδρομή χρήσης αντιμονίου

Παρά την τοξικότητα του, το Sb χρησιμοποιείται στην ιατρική και στα καλλυντικά από την αρχαιότητα. Η ιστορία του ξεκινά το 3100 π. Χ. όταν οι Αιγύπτιοι το χρησιμοποιούσαν ως κόσμημα στην μορφή μαύρου Sb_2S_3 .

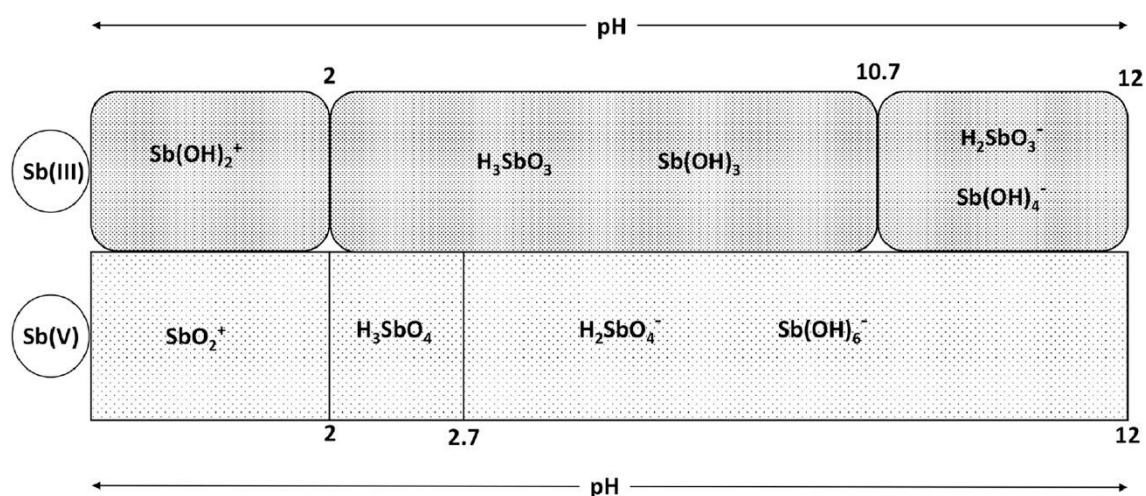
Μερικά παραδείγματα της ιστορικής χρησιμότητας του παρατίθενται παρακάτω

1. Στην αρχαία Αίγυπτο, κατάπιναν συστατικό που περιείχε σουλφίδιο του αντιμονίου για να προστατευθούν από εντερικά σκουλήκια.
2. Οι αρχαίοι Έλληνες, το χρησιμοποιούσαν για την προστασία του δέρματος.
3. Στον Μεσαίωνα, είχε την χρήση του καθαρτικού και της πρόκλησης του εμετού (Terence Bell et al., 2015).

Πλέον χρησιμοποιείται στην φαρμακοβιομηχανία ως φάρμακο για την θεραπεία ασθενών που έχουν μολυνθεί με παράσιτα (Λεϊσμανίαση και στην Σχιστοσωμίαση) και κάποιες ενώσεις αντιμονίου χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS (Antoine Pierart et al., 2015).

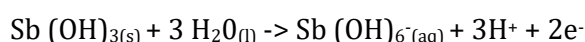
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Αντιμόνιο και pH

Γενικότερα το pH παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην βιοδιαθεσιμότητα του αντιμονίου αλλά και στην ειδογένεια του. Όπως φαίνεται και από την παρακάτω φωτογραφία το Sb(III) σε ένα εύρος pH 2-10.7, θα υπάρχει με την μορφή ουδέτερων μορίων όπως Sb(OH)_3 , H_3SbO_3 ή HSbO_2 . Σε πολύ όξινες συνθήκες ($\text{pH} < 2$), θα υπάρχει με την μορφή Sb(OH)_2^+ ή SbO^+ . Σε πολύ αλκαλικά περιβάλλοντα ($\text{pH} > 10.7$), κυριαρχεί υπό την μορφή Sb(OH)_4^- και H_2SbO_3^- . Παράλληλα, οι Zi-Qi Mu et al. (2022), βρήκαν ότι σε πάρα πολύ όξινες συνθήκες το Sb(III) επικρατούσε μόνο ως Sb^{3+} . Αντιθέτως το Sb(V) κυριαρχεί σε ένα μεγάλο εύρος pH (2.7-12) υπό τις μορφές Sb(OH)_6^- και H_2SbO_4^- . Από την τιμή 2-2.7, επικρατεί ως H_3SbO_4 , ενώ σε πολύ όξινες συνθήκες ($\text{pH} < 2$) υπάρχει με την μορφή SbO_2^+ (Indika Herath et al., 2017, Zi-Qi Mu et al., 2022).



ΕΙΚΟΝΑ 6. Αλλαγές στις μορφές του αντιμονίου από την επίδραση του pH (Indika Herath et al., 2017).

Πιο συγκεκριμένα, τα θετικά φορτισμένα είδη του αντιμονίου μπορούν να υπάρχουν μόνο σε αρκετά όξινες συνθήκες ($\text{pH} < 2$), ενώ το ιόν του αντιμονίτη ($\text{Sb}(\text{OH})_6^-$) και του υδροξειδίου του αντιμονίου ($\text{Sb}(\text{OH})_3$) είναι οι πιο συχνές ανόργανες μορφές του αντιμονίου σε φυσικά νερά. Το πεντασθενές αντιμόνιο είναι αρκετά ευδιάλυτο στο νερό σε σχέση με το τρισθενές και όταν διαλύεται παράγει ($\text{Sb}(\text{OH})_6^-$), το οποίο μπορεί διατηρεί το σθένος του σε ένα μεγάλο εύρος στην κλίμακα του pH (2.7-10.4). Αντιθέτως το τρισθενές είναι λιγότερο διαλυτό σε υδατικά διαλύματα ανεξάρτητα του pH λόγω του σχηματισμού αδιάλυτου υδροξειδίου του αντιμονίου ($\text{Sb}(\text{OH})_3$) (Kang et al., 2000, Krachler et al., 2001). Σε υψηλά αλκαλικά διαλύματα ($\text{pH} > 10.4$) το Sb_2O_3 έχει την τάση να διαχωρίζεται ως H_2SbO_3 είτε ως $\text{Sb}(\text{OH})_4^-$ και με αυτόν τον τρόπο το τρισθενές επικρατεί πάντα ως ουδέτερη ένωση σε ένα μεγάλο εύρος pH . Αυτό παρουσιάζεται και στην παρακάτω εξίσωση (Kang et al., 2000).



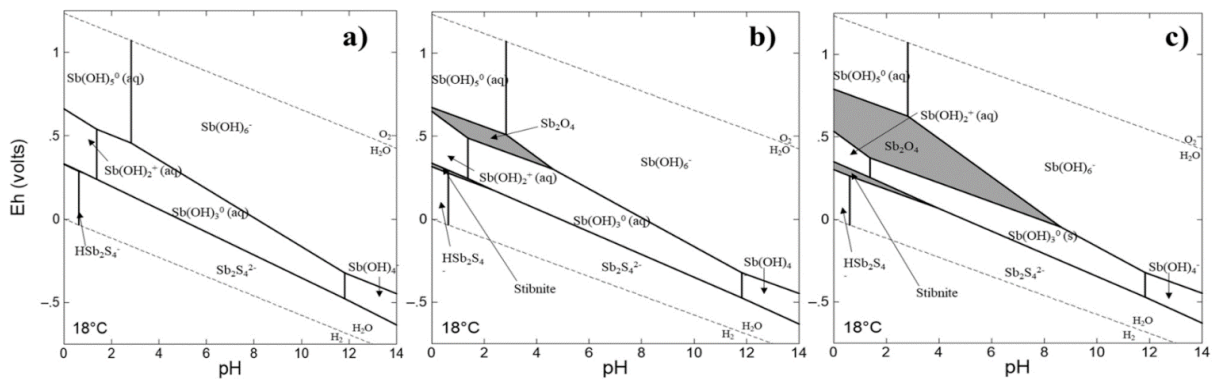
Επιπλέον, η κινητικότητα του πεντασθενές αντιμονίου είναι μεγαλύτερη από αυτήν του τρισθενές σε ουδέτερο pH . Από κάποιες έρευνες που έγιναν στο ορυχείο Ichinokawa στην Ιαπωνία έδειξαν ότι το τρισθενές αντιμόνιο $\text{Sb}(\text{III})$ μπορεί να οξειδωθεί σε πεντασθενές αντιμόνιο σε ένα αρνητικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh) και έτσι το πεντασθενές αντιμόνιο έχει πλήρη σταθερότητα σε οξικά περιβάλλοντα σε σχέση με το τρισθενές (Mitsunobu et al., 2006).

Έρευνες, έχουν δείξει ότι ένας σημαντικός γεωχημικός κύκλος του αντιμονίου στην φύση είναι η διάλυση και οξείδωση του $\text{Sb}(\text{III})$ από ορυκτά και βράχους που περιέχουν αντιμόνιο (Wilson et al., 2010, Wang X. Q. et al., 2011). Η διάλυση του αντιμονίου από ορυκτά είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από το pH (MarcBiver et al., 2012). Για παράδειγμα από μία έρευνα που έγινε το 2015 από τους (XingyunHu et al., 2015), τα θειούχα ορυκτά με αντιμόνιο διαλύονται κάτω από αλκαλικές συνθήκες ενώ τα οξείδια ορυκτών με αντιμόνιο απαιτούν όξινες συνθήκες για την διάλυση. Η αβιοτική οξείδωση του τρισθενές αντιμονίου είναι πολύ αργή σε ουδέτερες και αλκαλικές συνθήκες ($\text{pH} = 8.5$).

Μία θεωρία είναι ότι τα βακτήρια μπορούν να διαλύουν ορυκτά που φέρουν αντιμόνιο αλλάζοντας το pH και στην συνέχεια οξειδώνουν το διαλυμένο $\text{Sb}(\text{III})$ σε $\text{Sb}(\text{V})$.

Επιπλέον, η διαλυτότητα του τρισθενές αντιμονίου εξαρτάται από το pH σε ένα εύρος 2-10, (Schulze et al., 1883).

Το αντιμόνιο γενικότερα υπάρχει σε 4 καταστάσεις οξείδωσης (-III, 0, III, V). Αλλά συνήθως εμφανίζεται σε βιολογικά περιβάλλοντα σε δύο βασικές καταστάσεις οξείδωσης ως $\text{Sb}(\text{V})$ – Αντιμονικό και $\text{Sb}(\text{III})$ - Αντιμονίτης. Το $\text{Sb}(\text{V})$ συνήθως βρίσκεται σε οξικά περιβάλλοντα ενώ το $\text{Sb}(\text{III})$ σε ανοξικά περιβάλλοντα. Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι μπορούν να



ΕΙΚΟΝΑ 7. Οι κύριες μορφές του αντιμονίου σε διαφορετικές τιμές pH αλλά και δυναμικό οξειδοαναγωγής στους 18 °C (Yidan Zhang et al., 2022).

συνυπάρχουν ταυτόχρονα και στα 2 περιβάλλοντα σε διαφορετικές αναλογίες σε ανοξικά και οξικά περιβάλλοντα (Filella et al., 2002). Επιπλέον, η ύπαρξη μεθυλιωμένων ειδών αντιμονίου έχει βρεθεί σε εδάφη και σε φυτά σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Duester et al., 2005). Η μεθυλίωση του αντιμονίου είναι αποτέλεσμα του μικροβιακού μεταβολισμού (Li et al., 2016, Grob et al., 2018). Η συμπεριφορά του αντιμονίου εξαρτάται από

- 1) την οξειδωτική του κατάσταση -για παράδειγμα υπάρχουν αναφορές ότι το Sb (III) είναι 10 φορές πιο τοξικό από το Sb(V)
- 2) από τα φυτικά είδη τα οποία μπορούν να απορροφήσουν πιο εύκολα το Sb(III) ή το Sb (V).

Το αντιμόνιο συνήθως βρίσκεται στα εδάφη με την μορφή οξειδίων, υδροξειδίων ή οξειανιόντων. Το τρισθενές αντιμόνιο αποτελεί την πιο εμπορική ένωση του αντιμονίου. Βρίσκεται στην φύση ως το ορυκτό βαλεντινίτης (εικόνα 8α) αλλά και σεναρμοντίτης. Ο βαλεντινίτης εμφανίζεται ως προϊόν διάβρωσης του στιβνίτη και άλλων ορυκτών αντιμονίου και είναι δίμορφο με το ισομετρικό οξείδιο του αντιμονίου σεναρμοντίτης. Διαλύεται σε υδατικά διαλύματα με υδρόλυση. Επιπλέον, ένα μικτό οξείδιο του αρσενικού - αντιμονίου εμφανίζεται στην φύση ως το πολύ σπάνιο ορυκτό στιβιοκλαουδίτη με τον χημικό τύπο: AsSbO_3 (εικόνα 8β) (Wikipedia).

α)



β)



ΕΙΚΟΝΑ 8^Α Βαλεντινίτης (Wikipedia) ΕΙΚΟΝΑ 8^Β Στιβιοκλαουδίτης από το ορυχείο Tsumeb, περιοχή Oshikoto, Namibia (Gary Zito et al., 2009).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μηχανισμοί αποκατάστασης από αντιμόνιο

Από το 1970 πολλές μελέτες έχουν γίνει για τις αποτελεσματικότερες τεχνικές αποκατάστασης του αντιμονίου (Zhang et al., 2019, Hassan et al., 2020, Long et al., 2020). Μερικές από τις πιο σημαντικές είναι 1) η κατακρήμνιση πήξης 2) η ηλεκτροχημεία 3) η ανταλλαγή ιόντων 4) η προσρόφηση και τέλος 5) η διήθηση μεμβράνης. Οι παραπάνω μηχανισμοί έχουν αναπτυχθεί για την αποκατάσταση εδαφών που έχουν ρυπανθεί από το αντιμόνιο αλλά και άλλων βαρέων μετάλλων.

Παρακάτω θα αναλυθούν κάποιες από τις αναφερόμενες τεχνικές .

5.1. Αντιμετώπιση της ρύπανσης από αντιμόνιο σε ένα υγρό περιβάλλον

5.2. Βιορόφηση/ρόφηση/προσρόφηση

Οξύ-υδροξείδια σιδήρου/μαγνησίου/αλουμίνιου έχουν αναγνωριστεί ως φυσικοί παράγοντες δέσμευσης του Sb στο περιβάλλον. Η ακινητοποίηση του αντιμονίου στο περιβάλλον γίνεται μέσω της καθίζησης με αλκαλικά μέταλλα, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται εξαιρετικά σταθερές ορυκτές φάσεις, πχ το αντιμονικό ασβέστιο (Herath et al., 2017). Τα προσροφητικά του αντιμονίου ταξινομούνται χονδρικά σε ανόργανους προσροφητές, αργιλικά ορυκτά και συστατικά εδάφους και οργανικά προσροφητικά. Από τα παραπάνω, τα οργανικά προσροφητικά είναι τα πιο σημαντικά περιβαλλοντικά ροφητικά που ρυθμίζουν την κινητικότητα των διαλυμένων ειδών που υπάρχουν στα επιφανειακά ύδατα, τα υπόγεια ύδατα το έδαφος και τα ιζήματα. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ελέγχου περιλαμβάνουν το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh), το pH, το διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC), τους οργανικούς και ανόργανους συνδέτες, τη

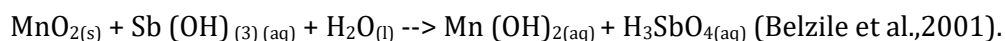
θερμοκρασία και άλλα (Mengchang He et al., 2018). Ο μηχανισμός προσρόφησης βασίζεται στον μηχανισμό ανταλλαγής προσδέματος με επιφανειακές δομικές ομάδες OH₂ ή OH⁻ στις θέσεις προσρόφησης (Jain et al., 1999).

5.2.1. Προσρόφηση από ανόργανους προσροφητές - προσρόφηση από οξείδια σιδήρου(Fe)

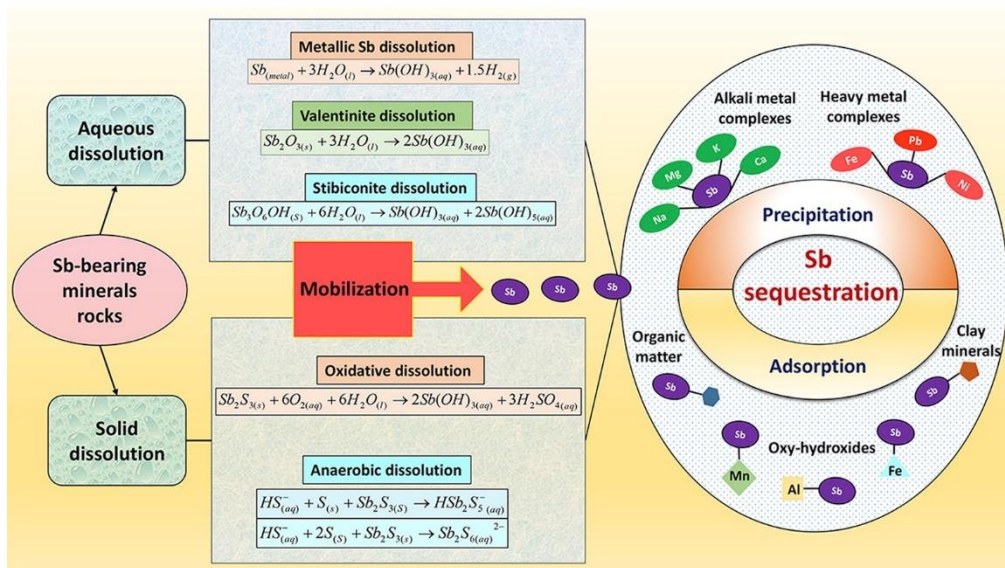
Πολλές μελέτες των Xi and He(2013), Kolbe et al.(2011), έχουν δείξει ότι τα οξείδια ή τα υδροξείδια σιδήρου έχουν υψηλότερη συγγένεια με το Sb σε φυσικά περιβαλλοντικά μέσα. Οξείδια με βάση το σίδηρο αναπτύχθηκαν με επιτυχία ως νέα προσροφητικά με την σημαντική αφαίρεση Sb (III)/Sb(V) (Mengchang He et al., 2018). Όπως φαίνεται και από την παρακάτω εικόνα, παρατηρείται ότι η κινητικότητα του αντιμονίου μπορεί να περιοριστεί είτε με προσρόφηση σε οργανική ύλη, οξυυδροξείδια ή ορυκτά αργιλίου. Από την άλλη υπάρχει και η κατακρήμνιση με σχηματισμό αλκαλικών μετάλλων ή με άλλα βαρέα μέταλλα.

5.2.2. Προσρόφηση από οξείδια μαγγανίου(Mn)

Τα οξείδια και οξυυδροξείδια του μαγγανίου θεωρούνται ως ισχυρά οξειδωτικά μέσα στα φυσικά περιβάλλον (Mengchang He et al., 2018). Συγκεκριμένα τα οξυυδροξείδια του μαγγανίου παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην μείωση της κινητικότητας του αντιμονίου μέσα από τους μηχανισμούς οξείδωσης και προσρόφησης (Wang et al., 2012). Η φυσική μορφή ύπαρξης μαγγανίου βιολιθίου (δ-MnO₂) έχει χαρακτηριστεί ως κατάλληλο ορυκτό για την ακινητοποίηση του Sb(V), σε ρυπασμένα εδάφη (Mengchang He et al., 2018). Ο μηχανισμός προσρόφησης του Sb(III) από ένα σύνθετο οξυυδροξείδιο μαγγανίου σε ένα περιβάλλον απουσίας οξυγόνου παρουσιάζεται παρακάτω,

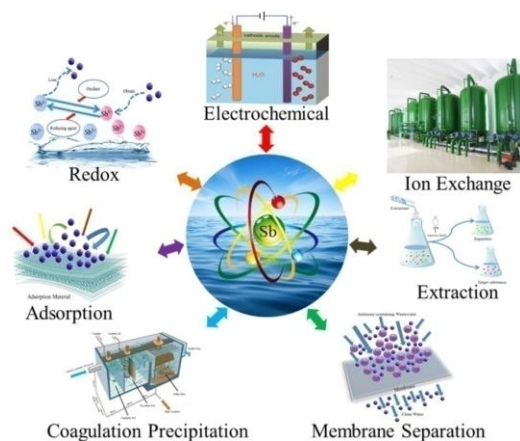


Επιπλέον, οι Belzile et al.(2001), Wang et al. (2012), και Thanabalasingam and Pickering (1990) χαρακτήρισαν την ικανότητα των οξειδίων μαγγανίου μεγαλύτερη των οξυυδροξειδίων του σιδήρου στη οξείδωση του Sb (III). Προκύπτει το συμπέρασμα, ότι η προσρόφηση του αντιμονίου από την φυσική ύπαρξη του οξυυδροξειδίου του μαγγανίου αποτελεί ένα φυσικό μηχανισμό αποτοξικοποίησης του αντιμονίου, με τον οποίο το τοξικό ανόργανο Sb (III) που βρίσκεται σε υδάτινο περιβάλλον απουσίας οξυγόνου μπορεί να οξειδωθεί στο λιγότερο τοξικό Sb(V) κατά την μεταφορά του σε περιβάλλον απουσίας οξυγόνου (Mengchang He et al., 2018).



ΕΙΚΟΝΑ 9.Οι διάφορες μορφές διάλυσης του αντιμονίου (Indika Herath et al., 2017).

Η προσθήκη ιόντων σιδήρου έχει παρατηρηθεί ότι καλυτερεύει την οξειδωση του αντιμονίου από τα βακτήρια που μειώνουν το θείο (SRB- sulfate reducing bacteria). Από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους (YanniXi et al., 2020) βρέθηκε ότι με την προσθήκη ιόντων σιδήρου Fe(II) ενισχύεται ο μηχανισμός της βιοεξυγίανσης. Αυτό συμβαίνει διότι τα ιόντα σιδήρου επιταχύνουν την κατανάλωση του H^+ και του θειούχου άλας αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την δραστηριότητα της υδρογονάσης και έτσι ενισχύουν το μεταβολικό μονοπάτι των βακτηρίων και της αναγωγής του Sb (V).



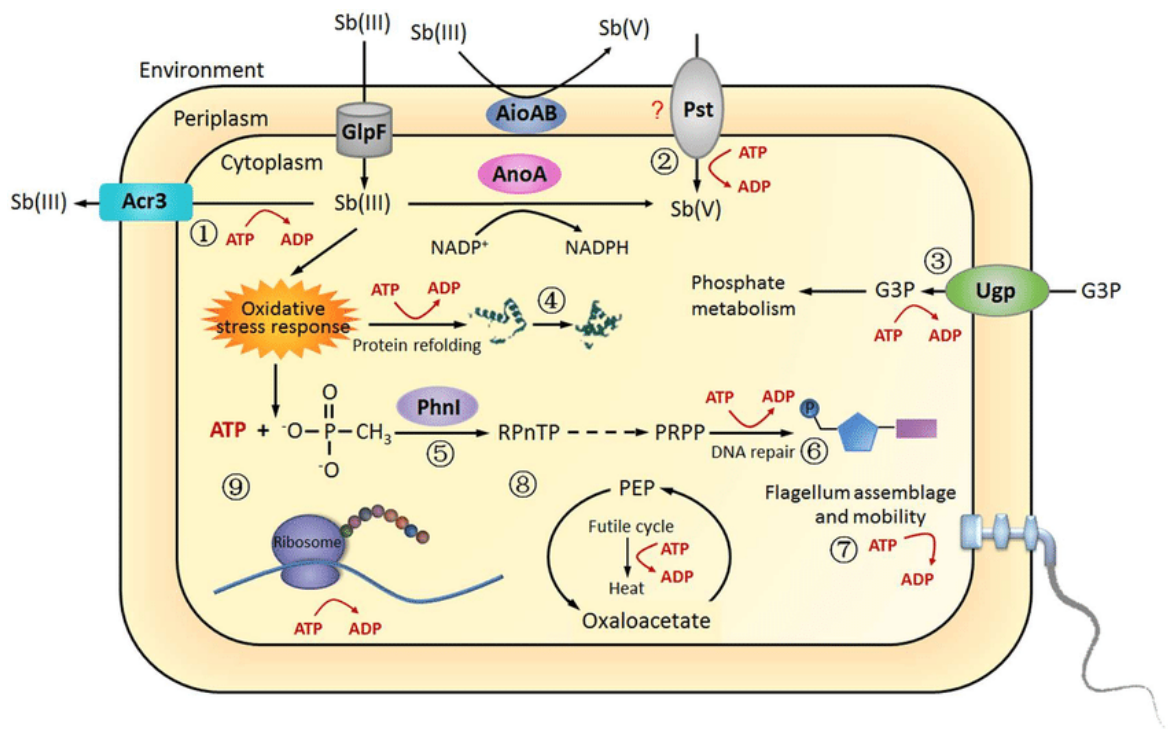
ΕΙΚΟΝΑ 10. Μηχανισμοί αποκατάστασης αντιμονίου σε ένα υγρό περιβάλλον (Yang Zhang et al., 2021).

Στην παραπάνω φωτογραφία παρατηρείται από τα αριστερά πάνω προς τα δεξιά η 1) οξειδοαναγωγή 2) ηλεκτροχημική μέθοδος 3) ανταλλαγή ιόντων 4) εξαγωγή 5) διαχωρισμός με την μέθοδο μεμβράνης 6) πήξη -κροκίδωση 7) ρόφηση (Yang Zhang et al., 2021).

5.3. Οξείδωση - Αναγωγή

Σημασία της ύπαρξης των βακτηρίων στην αποκατάσταση του αντιμονίου

Τα οξειδωτικά βακτήρια του αντιμονίου, παίζουν σημαντικό ρόλο στον βιογεωχημικό κύκλο του αντιμονίου (Filella et al., 2007), καθώς είναι ικανά να μετατρέψουν το πιο τοξικό Sb(III) στο λιγότερο τοξικό και περισσότερο κινητό Sb(V) (Li et al., 2015, Loni et al. 2020), κάτι το οποίο είναι αρκετά σημαντικό για την περιβαλλοντική αποκατάσταση από το αντιμόνιο. Η συγκεκριμένη οξείδωση είναι εξαιρετικά αργή στο περιβάλλον χρησιμοποιώντας το οξυγόνο (O_2) ως δέκτη ηλεκτρονίων. Τα οξειδωτικά βακτήρια του Sb(III) επηρεάζουν τους περιβαλλοντικούς κύκλους Sb, επιταχύνοντας αυτή την οξείδωση στο περιβάλλον (Levett et al., 2020). Λίγα είναι ακόμα γνωστά για τους μηχανισμούς των βακτηριακών ειδών, ένας από τους οποίους είναι η εμπλοκή τους στην οξείδωση του αντιμονίου. Γενικότερα η μικροβιακή αποκατάσταση περιλαμβάνει 2 μονοπάτια. Το ένα εκ των 2 είναι η οξείδωση του Sb (III) σε Sb (V) όπως αναφέρθηκε και παραπάνω από τους μικροοργανισμούς. Υπάρχουν κάποια αυτότροφα βακτήρια που χρησιμοποιούν την οξείδωση του Sb (III) για την παραγωγή ενέργειας ώστε να ενισχύσουν την χημειοαυτότροφη τους ανάπτυξη. Από την άλλη για τα ετερότροφα βακτήρια η οξείδωση του Sb(III) αποτελεί σημαντικό μηχανισμό αποτοξικοποίησης, ο οποίος βοηθάει τα βακτήρια να αντιστέκονται στην τοξικότητα του αντιμονίου (Li et al., 2019). Το δεύτερο μονοπάτι αποτελεί την μείωση του Sb (V) σε Sb (III). Το Sb (III) είναι αρκετά πιο τοξικό σε σχέση με το Sb (V) όμως είναι λιγότερο διαλυτό. Μπορεί όμως εύκολα να σχηματίσει στέρεες μορφές όπως $Sb(OH)_3$ ή να κατακρημνιστεί με θείο και να σχηματίσει Sb_2S_3 . Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι το ενζυμικό μονοπάτι είναι πολύ σημαντικό για τον μικροβιακό μεταβολικό μετασχηματισμό. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να μετατρέψουν το Sb (III) σε Sb (V) μέσα από το μονοπάτι του ενζύμου *aiOA*. Πιο συγκεκριμένα η Sb (III) οξειδάση κωδικοποιημένη από το γονίδιο *AnoA* που ανήκει στην οικογένεια της αφυδρογονάσης /αναγωγάσης που προκαλείται από το Sb(III), βρέθηκε πρόσφατα ότι είναι υπεύθυνη για την αερόβια οξείδωση του Sb(III) (Jingxin Li et al., 2020). Επιπλέον, οι Li et al. (2017), υπέδειξε ότι το ένζυμο *AioAB*, είναι υπεύθυνο για την οξείδωση του Sb (III) στο περιπλασμίδιο διότι, χωρίς το *AioAB*, περισσότερο Sb(III) εισέρχεται στα κύτταρα ρυθμίζοντας την κυτταροπλασματική Sb(III) οξειδάση *AnoA*, καθώς και τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην απόκριση του κυτταρικού οξειδωτικού στρες. Με αυτόν τρόπο αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της οξείδωσης του Sb(III). Όσον αφορά την μορφολογία της αναγωγής του Sb(V) εξαρτάται σε τεράστιο βαθμό από τον δότη ηλεκτρονίων. Η χρήση διαφορετικών ηλεκτρονιακών δοτών βοηθάει σε σημαντικό βαθμό τις βακτηριακές κοινότητες για την αναγωγή του Sb (V) και εντέλει στη βιοαποκατάσταση. Οι Nguyen et al., (2018) μέσα από πειράματα που πραγματοποίησαν και την δοκιμή διαφόρων ηλεκτρονιακών δοτών συμπέραναν ότι οι ανόργανοι ηλεκτρονιακοί δότες όπως το H_2 , μπορούν να αυξήσουν το ποσοστό ανάκτησης ηλεκτρονίων, ενώ η χρήση των οργανικών ηλεκτρονιακών δοτών όπως η γλυκόζη είχε ως αποτέλεσμα τη γρήγορη αναγωγή του Sb(V).



ΕΙΚΟΝΑ 11. Ένα μοντέλο βακτηριακού ενεργειακού μεταβολισμού σε απόκριση στο Sb(III) στο *A. tumefaciens* GW4 (Jingxin Li et al., 2020).

Η παραγόμενη ενέργεια που προέκυψε από τη διαδικασία οξείδωσης Sb(III) χρησιμοποιήθηκε για την (1) εκροή Sb(III), την (2) μεταφορά Pi ή Sb(V), (3) Μεταφορά G3P, την (4) αναδίπλωση πρωτεΐνης τον (5) μεταβολισμό φωσφονικών, την (6) επισκευή DNA την (7) συγκέντρωση και κινητικότητα μαστιγίων την (8) απελευθέρωση θερμότητας και τέλος την (9) πρωτεϊνοσύνθεση (Jingxin Li et al., 2020).

Γενικότερα, οι Renjian Deng et al. (2018), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι εξαιτίας της μακροχρόνιας τοξικότητας του αντιμονίου που υποβάλλονται τα βακτήρια έχουν αναπτύξει και εξελίξει μηχανισμούς ώστε να αντιστέκονται στο αντιμόνιο αλλά και να μπορούν να το οξειδώνουν. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να είναι η πρόσληψη του Sb(III) (Suzuki et al., 1998), η εκροή του Sb (III) για την αποφυγή συσσώρευσης αντιμονίου στα κύτταρα η οποία αποτελεί έναν από τους πρωταρχικούς μηχανισμούς άμυνας των μικροοργανισμών στην τοξικότητα του Sb(III) (Rosen and Borbolla, 1984, Suzuki et al., 1998), και ο μηχανισμός μετασχηματισμού Sb(V) (Renjian Deng et al., 2021). Παρακάτω παρουσιάζονται βακτήρια που χρησιμοποιούν κάποιους από τους αναφερόμενους μηχανισμούς.

5.3.1.Οξειδωτικά βακτήρια ικανά για τη βιοαποδόμηση Sb(III) σε Sb(V)

Τα πρώτα οξειδωτικά βακτήρια που βρέθηκαν είναι τα εξής :

1. Το πρώτο Sb-oxidizing bacteria *Stibiobacter senarmontii* βρέθηκε το 1974 (Lialikova et al., 1974).
2. Οξείδωση του Sb(III) από *Agrobacterium tumefaciens* στέλεχος 5^A (Lehr et al., 2007). Μηχανισμός βιοέκπλυσης από *Thiobacillus ferrooxidans* (Torma και Gabra, 1977).
3. Το παραπάνω βακτήριο μαζί με *T. Thiooxidans* και *L. Ferrooxidans* χρησιμοποιούνται στην βιοέκπλυση, δηλαδή για την ανάκτηση πολύτιμων μετάλλων βασισμένη στην καταλυτική οξείδωση των θειούχων ορυκτών. Η βιοέκπλυση περιλαμβάνει αβιοτικές και βιοτικές αντιδράσεις, συχνά με διαφορετικές απαιτήσεις (L.G.Leduc et al., 1994).

Η βιοέκπλυση χρησιμοποιείται για την επιτάχυνση της διαδικασίας της βιοεξόρυξης .

Όπου Βιοεξόρυξη είναι :

Η βιοεξόρυξη είναι η διαδικασία χρήσης μικροοργανισμών (μικροβίων) για την εξαγωγή μετάλλων, όπως ο χαλκός από μεταλλεύματα ή απόβλητα ορυχείων. Οι τεχνικές βιοεξόρυξης μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τον καθαρισμό χώρων που έχουν ρυπανθεί με μέταλλα (D BarrieJohnson, 2014).

Τα πλεονεκτήματα μεταξύ άλλων είναι τα παρακάτω

- Είναι μία οικονομική διαδικασία.
- Χαμηλό λειτουργικό κόστος και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας.
- Φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία καθώς παράγει ελάχιστη ποσότητα ρύπων.
- Η χρήση βακτηρίων μπορεί να οδηγήσει σε εξαγωγή αντίστοιχη όσο το 90% του συνολικού μετάλλου σε ένα ορυχείο, σε αντίθεση με το μόλις 60% του μετάλλου που εξάγεται με τις παραδοσιακές τεχνικές.

Οι μικροοργανισμοί (ως επί το πλείστον βακτήρια) που χρησιμοποιούνται για τη βιοεξόρυξη είναι φυσικά παρόντα σε χώρους εξόρυξης. Συνήθως χρησιμοποιούν κυρίως οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), ενώ χρησιμοποιούν το ίδιο το ορυκτό ως πηγή ενέργειας.

Εάν ένας χώρος εξόρυξης αφεθεί μόνος του, οι μικροοργανισμοί θα απελευθερώσουν τελικά χαλκό από τα πετρώματα, αλλά αυτό θα μπορούσε να διαρκέσει εκατοντάδες χρόνια.

Για να επιταχυνθεί η διαδικασία σε ένα εργαστήριο βιοεξόρυξης, οι επιστήμονες χρησιμοποιούν βιοέκπλυση (D BarrieJohnson, 2014).

Σύμφωνα με τους Renjian Deng et al.(2018), υπάρχουν παραπάνω από 90 βακτηριακά στελέχη ικανά να οξειδώσουν το Sb (III) σε Sb (V).

Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους (Jie Li et al., 2013) στην Wuhan της Κίνας 25 ανθεκτικά βακτήρια σε Sb(III) απομονώθηκαν από ορυχείο εξόρυξης αντιμονίου Xikuangshan, 6 από τα οποία βρέθηκαν να είναι ικανά να οξειδώσουν το Sb(III) σε Sb(V). Τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη αναφέρονται παρακάτω

1. *Acinetobacter* sp. JL7.
2. *Comamonas* sp. JL25.
3. *Comamonas* sp. JL40.
4. *Comamonas* sp. S44.
5. *Stenotrophomonas* sp. JL9.
6. *Variovorax* sp. JL23.

Το στέλεχος S44 έδειξε τον μεγαλύτερο βαθμό οξείδωσης του Sb(III), το οποίο μπορούσε υπό αερόβιες συνθήκες (με την παρουσία οξυγόνου) να οξειδώνει 50 μ M Sb(III) σε Sb(V) σε διάρκεια 3 ημερών.

Οι Xiong et al.(2011), Li et al.(2013), ανακάλυψαν ότι το *Comamonas testosteroni* S44, μπορούσε να οξειδώνει το Sb(III). Παράλληλα οι Terry et al.(2015), βρήκαν ότι το αυτότροφο βακτήριο *Hydrogenophaga taeniospiralis* IDSBO-1, το οποίο περιέχει το γένος *aioA* μπορούσε να οξειδώνει το Sb(III) υπό αναερόβιες συνθήκες χρησιμοποιώντας ως δέκτη ηλεκτρονίων το NO_3^- . Επιπλέον, η απομόνωση των *Hydrogenophaga* sp. strain IDSBO-1, *Variovorax* sp. strain IDSBO, *Shinella* sp. NLS1 και *Ensifer* sp. NLS4 από ορυχεία και εδάφη αντιμονίου μπορούσαν να οξειδώνουν το Sb (III) σε Sb(V), υπό αερόβιες συνθήκες (Mengchang He et al., 2018). Αξιοσημείωτο είναι ότι κάποια αυτόχθονα βακτήρια όπως *Bosea* sp. AS (Lu et al., 2018), *Pseudomonas* sp. AO-1, *Enterobacter* sp. AO-3 και *Pseudomonas* sp. ZH1 (Hua et al., 2019) τα οποία προήλθαν από έδαφος με μεγάλη ρύπανση αντιμονίου ($16,312-5,000 > \text{mg/kg}$) παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη αντοχή στο αντιμόνιο σε σχέση με τα ίδια γένη των μη αυτόχθονων βακτηρίων (Gu et al., 2019). Επιπλέον, το βακτηριακό στέλεχος *Venenivibrio stagnispumantis* strain CP. B2 ο πρώτος μικροοργανισμός που απομονώθηκε από την γεωθερμική πισίνα Waiotapu, Νέα Ζηλανδία (Champagne pool) 75 C, pH 5.5. Το νέο βακτήριο είναι ένα υποχρεωτικό χημειολιθότροφο ικανό να χρησιμοποιεί το H_2 ως δότη ηλεκτρονίων και το O_2 ως δέκτη ηλεκτρονίων και το CO_2 , ως πηγή άνθρακα. Αποκτά μεταβολική ενέργεια χρησιμοποιώντας την αντίδραση $\text{Knallgas } \text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ (Adrian Hetzer et al., 2008). Ακόμα έχει βρεθεί το στέλεχος *Paraccocus versutus* XT0.6, απομονωμένο από το μεγαλύτερο ορυχείο αντιμονίου (Xikuangshan antimony mine) ικανό να οξειδώνει το Sb (III) σε Sb(V) υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Prakash C. Loni et al., 2020). Οι Li et al.(2016), ανέφεραν ότι όλα τα Sb(III) οξειδωτικά στελέχη μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* και *Actinobacteria* και ότι τα *Pseudomonas*,

Comamonas, *Agrobacterium* και *Acinetobacter* είναι τα τέσσερα βασικά γένη που περιλαμβάνουν το 34%, 15%, 12%, και το 11% απ' όλα τα γνωστά Sb (III) οξειδωτικά βακτήρια στελέχη, αντίστοιχα.

Κάποια επιπλέον οξειδωτικά βακτήρια

1. Με μικροβιακή ρόφηση του Sb(III) βρέθηκε ικανό το *Bacillus subtilis* (Cai et al., 2018).
2. Με μικροβιακή ρόφηση του Sb(III) *Cyanobacterium Synechocystis* sp. (Zhang et al., 2011).
3. Με μικροβιακή ρόφηση του Sb(III) *Microcystis* sp. (Wu et al., 2012).

Εκτός των προκαρυωτικών οργανισμών που είναι ικανά για οξείδωση του τρισθενές αντιμονίου, από έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Shaun D. Frank et al. (2007), βρέθηκαν και ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί με οξειδωτική ικανότητα. Πιο συγκεκριμένα έγινε απομόνωση ενός οξινοθερμοφιλικού φυκιού που ανήκει στην τάξη των Cyanidiales. Αυτή θεωρείται η πρώτη αναφορά οξείδωσης από έναν ευκαρυωτικό οργανισμό.

Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας ορισμένων βακτηρίων ικανών για οξείδωση που έχουν μελετηθεί κατά καιρούς.

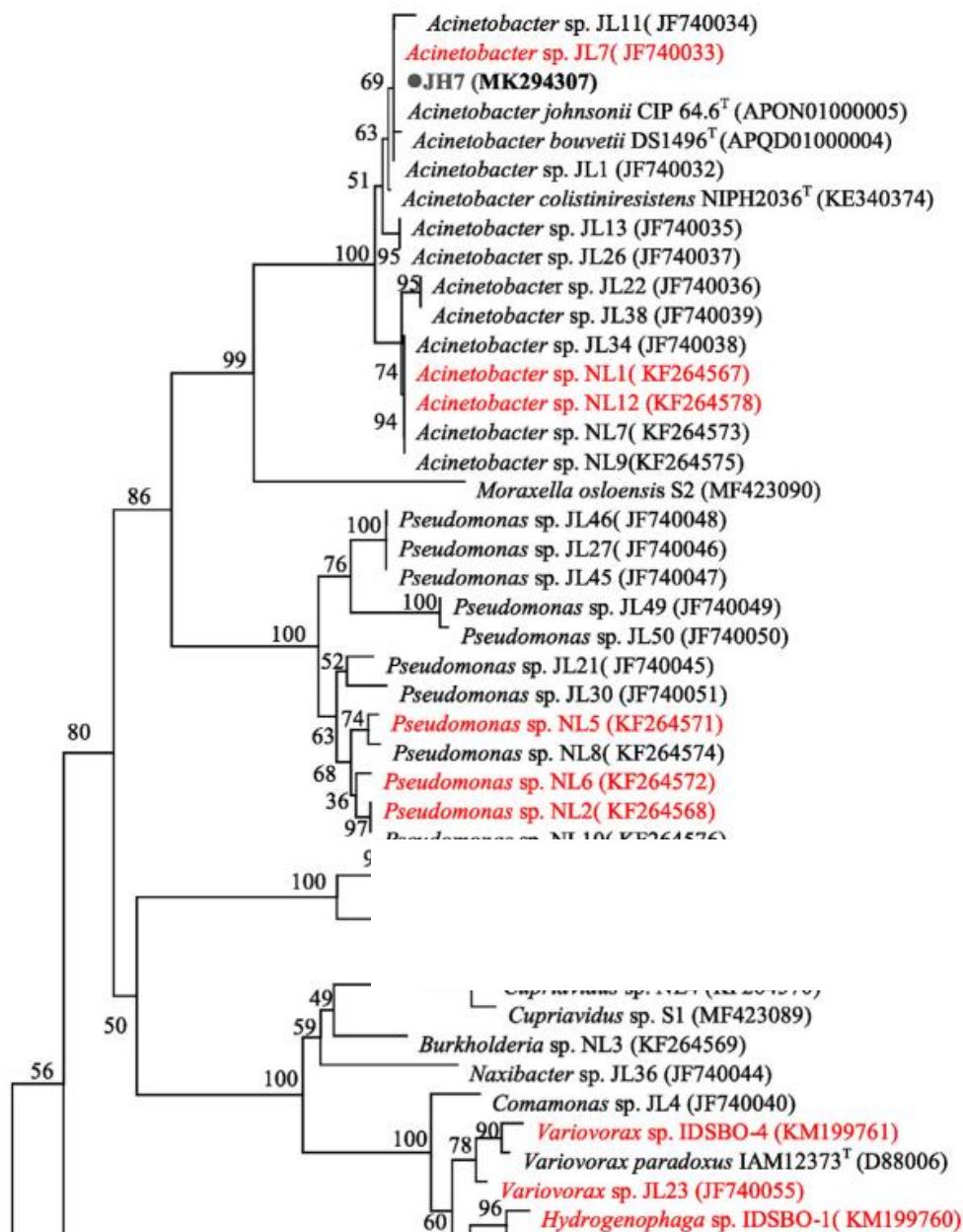
Πίνακας 3. Βακτήρια ικανά για οξείδωση του Sb(III), που έχουν μελετηθεί κατά καιρούς.

Βακτήρια ικανά για οξείδωση του Sb(III)	Συνθήκες Καλλιέργειας	pH	Πηγή άνθρακα	Πηγές
<i>Paraccocus versutus</i> XT0.6	Αερόβιες/ αναερόβιες	Αλκαλικές	Lactate/Nitrate	Prakash C. Loni et al., 2020.
Bosea sp. AS-1 αρνητικό κατά gram	Αερόβιες	Αλκαλικές pH=8	Sodium Lactate/yeast	Xiaolu Lu et al., 2018
<i>Bacillus</i> sp. S3	Αερόβιες	Αλκαλικές 7-7.2	yeast	Jiaokun Li et al., 2020
<i>Roseomonas rhizosphaerae</i> YW11	Αερόβιες	Απροσδιόριστο	Yeast, glucose, starch Sodium pyruvate	Li-Na Sun et al., 2020
<i>Shinella</i> sp. NLS1	Αερόβιες	Απροσδιόριστο	Yeast/ potassium antimony (III) tartrate	Nguyen et al., 2017
<i>Ensifer</i> sp. NLS4	Αερόβιες και Αναερόβιες	Ουδέτερες	Yeast/ potassium antimony (III) tartrate	Nguyen et al., 2017
<i>Acinetobacter</i> sp. JH7 κατά gram αρνητικό	Αερόβιες	Από 5-9 Με το πιο αποτελεσματικό να είναι pH=7	Sodium lactate /citrate	Jihai Gu et al., 2019
<i>Flavihumibacter stibioxidans</i> sp. nov	Αερόβιες	6-9. Αποτελεσματικότερο pH =7	Yeast/glucose/sodium pyruvate	Yushan Han et al., 2016

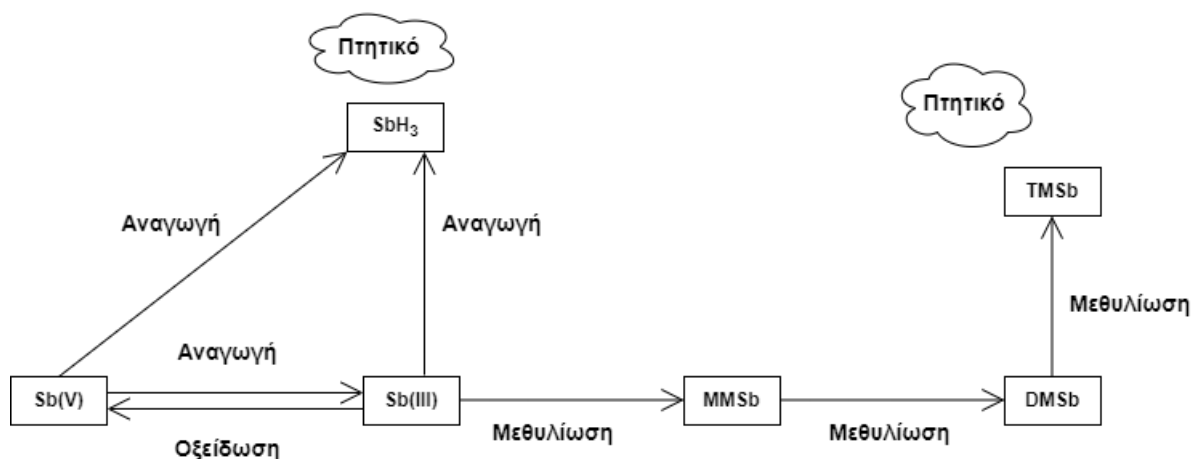
Comamonas sp. JL40	Αερόβιες	Απροσδιόριστο	Glucose	Jie Li.et al., 2013
Comamonas sp. S44	Αερόβιες	Απροσδιόριστο	Glucose	Jie Li.et al., 2013

5.3.2. Αναγωγή -μετατροπή του Sb(V) σε Sb (III)

Από διάφορες έρευνες των Abin et al.(2017), Nguyen et al.(2018), που έχουν πραγματοποιηθεί ανά τον κόσμο, έχει βρεθεί ότι η μικροβιακή μείωση του πεντασθενές αντιμονίου σε τρισθενές αντιμόνιο είναι γεγονός. Υπό αναερόβιες συνθήκες κάποια βακτήρια είναι ικανά να μετατρέψουν το Sb(V) σε Sb(III) (Renjian Deng et al., 2021). Η μικροβιακή αναγωγή του Sb(V) οδηγεί σε συσσώρευση του Sb(III) ,και με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η κινητικότητα αλλά αυξάνεται η τοξικότητα (Huaqing Liu et al., 2022). Οι Kantin et al. (1983) ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν ότι τα μικροάλγη *Sargassum* sp. μπορούν να μειώσουν το Sb(V) σε Sb(III) σε θαλάσσιο νερό. Πιο συγκεκριμένα από μια πρόσφατη έρευνα των Yang et al.(2021), έχουν αναφερθεί 2 απομονωμένα είδη ικανά για αναγωγή του Sb (V) σε Sb(III), το *Dechloromonas* sp.AR-2 και *Propionivibrio* sp.AE-3. Τα παραπάνω μπορούσαν να μειώσουν το πεντασθενές αντιμόνιο υπό αναερόβιες αλλά και μικροαεροφιλικές συνθήκες .Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να μειώσουν το Sb(V) ακολουθούν κυρίως 2 μεταβολικά μονοπάτια, αφενός το μονοπάτι της αναπνευστικής μείωσης και αφετέρου της μη αναπνευστικής μείωσης. Πιο αναλυτικά όσον αφορά το πρώτο μονοπάτι κάποια Sb(V) αναπνευστικά βακτήρια όπως *Shewanella* sp.ANA-3 και *Desulfuribacillus stibiiarsenatis* MLFW-2, χρησιμοποιούν το Sb(V) ως δέκτη ηλεκτρονίων για την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας για την ανάπτυξη τους (Liyang Wang et al., 2020). Από άλλη παρόμοια έρευνα των Abin και Hollibaugh (2017) βρέθηκε ότι το στελέχος *Desulfuribacillus stibiiarsenatis* strain MLFW-2 το οποίο χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων το sodium lactate και ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων το Sb(V) για μικροβιακή αναπνοή μπορούσε να παράγει μικροκρυστάλλους Sb₂O₃. Ακόμα οι Nguyen et al.(2014), παρήγαγαν άμορφα νανοσωματίδια Sb₂O₃ από την ετερότροφη ανάπτυξη του στελέχους *Sinorhizobium* sp.JUK-1 που χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων το οξικό ιόν.



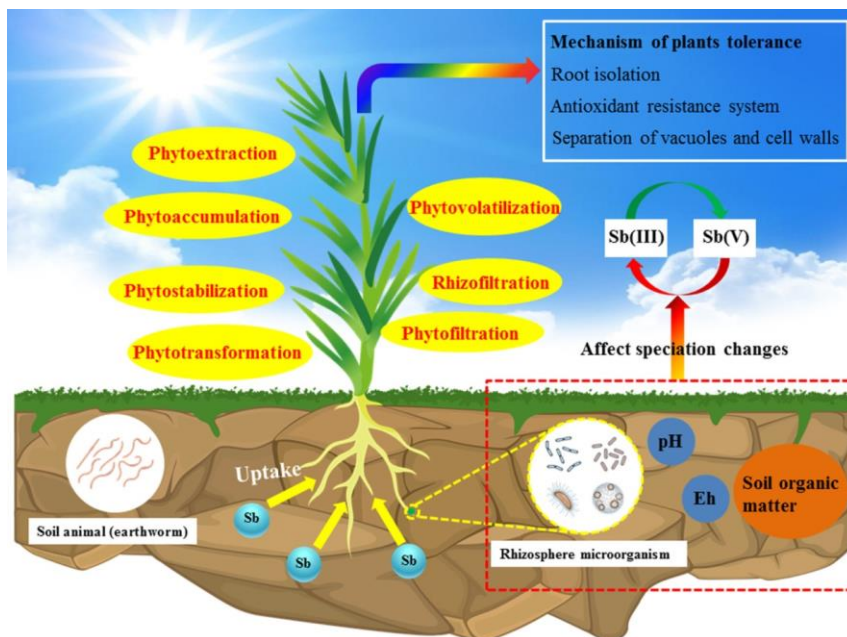
ΕΙΚΟΝΑ 12(Φυλογενετικό δέντρο, βασισμένο στο 16 ΣΤΟ 16rna γονίδιο που δείχνει την γενετική σχέση του *Acinetobacter* στελέχους Jh7 με αναφορά άλλα βακτηριακά στελέχη. τα στελέχη με κόκκινο παρουσιάζουν τα βακτήρια που είναι ικανά να οξειδώνουν το $Sb(III) \rightarrow Sb(V)$, ενώ με μαύρο τα στελέχη βακτηρίων που είναι ικανά να μειώσουν το $Sb(V) \rightarrow Sb(III)$ (J.Gu et al.,2019).



ΕΙΚΟΝΑ 13. Οι οδοί μετασχηματισμού του αντιμονίου από τους μικροοργανισμούς (Christon J.Hurst, 2022).

5.4. Φυτοαποκατάσταση/ Phytoremediation

Η εφαρμογή συμβιωτικών σχέσεων των φυτών με τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο έδαφος για την αποκατάσταση περιοχών ρυπασμένων με αντιμόνιο ξεκίνησε με την φυτοαποκατάσταση.



ΕΙΚΟΝΑ 14 .Οι μηχανισμοί φυτοαποκατάστασης σε ένα έδαφος ρυπασμένο με αντιμόνιο (Yang Zhang et al.,2021).

Οι παραπάνω μηχανισμοί φυτοαποκατάστασης είναι οι εξής :

Phytoextraction-φυτοεξαγωγή, Phytoaccumulation, φυτοσυσσώρευση, Phytostabilization – φυτοσταθεροποίηση, Phytotransformation Φυτομετασχηματισμός, Phytofiltration- Φυτοδιήθηση, Rhizofiltration-Ριζοδιήθηση, Phytovolatilization- Φυτοεξαρίωση (Yang Zhang et al., 2021).

Το αντιμόνιο δεν είναι απαραίτητο θρεπτικό στοιχείο για τα φυτά (Pierart et al., 2015) ωστόσο το διαλυμένο σε νερό αντιμόνιο μπορεί να προσληφθεί εύκολα από τα φυτά (Baroni et al., 2000). Η πρόσληψη του αντιμονίου από τα φυτά μπορεί να προκαλέσει αναστολή της φωτοσυνθετικής διαδικασίας (Chai et al., 2016) και της σύνθεσης διαλυτών πρωτεϊνών, διαλυτής ζάχαρης και αμύλου (Feng et al., 2013) όπως και ανισορροπία των θρεπτικών στοιχείων (Shtangeeva et al., 2014). Τα φυτά παρουσιάζουν διαφορετικές ικανότητες να απορροφούν διαφορετικά είδη αντιμονίου και η πλειοψηφία των φυτών θα απορροφήσει περισσότερο αντιμόνιο όταν εκτίθεται σε Sb(III) παρά σε Sb(V) (Huang et al., 2012, Tisarum et al., 2015). Μερικά από αυτά τα φυτά είναι το σιτάρι, ο ηλίανθος (*Helianthus annuus L.*), το κριθάρι (*Hordeum vulgare L.*) και το ρύζι (Zhu et al., 2020). Αντιθέτως οι Shtangeeva et al. (2012), βρήκαν ότι η πρόσληψη του αντιμονίου από τη σίκαλη ήταν μεγαλύτερη όταν αντιμετωπιζόταν με Sb(V) από ότι με Sb(III).

Ανάμεσα σε διάφορες μεθόδους βιοεξυγίανσης, η φυτοεξυγίανση θεωρείται μια αρκετά ελπιδοφόρα τεχνολογία για το γεγονός ότι είναι αρκετά οικονομική και αποτελεσματική μέθοδος. Ακόμα ένα επιπλέον θετικό χαρακτηριστικό της είναι ότι η φυτοεξυγίανση γίνεται *in situ*, δηλαδή στο μέρος που υπάρχει η ρύπανση χωρίς να γίνεται μεγάλη επέμβαση στο περιβάλλον και χωρίς να διαταράσσεται η ομοιοστάση των ζώντων οργανισμών. Εξ ορισμού η φυτοεξυγίανση αποτελεί την χρήση των μεταβολικών μονοπατιών των φυτών για να απορροφήσουν, εξάγουν, μετασχηματίσουν και να σταθεροποιήσουν τα μέταλλα στο έδαφος (Yang Zhang et al., 2021). Οι μηχανισμοί δράσης περιλαμβάνουν την φυτοεξαγωγή, τη φυτοσυσσώρευση, τη φυτοακινητοποίηση, το φυτομετασχηματισμό, τη ριζοδιήθηση, και τη φυτοτοξικότητα. Πολλά φυτά έχουν διαφορετικές προσροφητικές ικανότητες αναλόγως τις διάφορες μορφές που βρίσκεται το αντιμόνιο στο έδαφος. Για παράδειγμα κάποια φυτά όπως ο ηλίανθος, το σιτάρι και το ρύζι μπορούν να απορροφήσουν ευκολότερα Sb(III) από ότι Sb(V). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια του ρυζιού απωθείται από το αρνητικά φορτισμένο (Sb(OH)_6^- Sb(V)) σε σχέση με το ηλεκτρικά ουδέτερο (Sb(OH)_3 Sb(III)). Ένα από τα φυτά που έχουν μελετηθεί και έχει παρατηρηθεί μεγάλη ανεκτικότητα στο αντιμόνιο είναι η φτέρη και πιο συγκεκριμένα το είδος *Dryopteris alba* (Feng et al., 2008). Από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Cidu et al., (2014), προέκυψε το συμπέρασμα ότι στις ρίζες των φυτών υπάρχει η μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιμονίου, λόγω της άμεσης επαφής του με το έδαφος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε πειραματική εκπόνηση της τεχνολογίας της βιοεξυγίανσης από ρυπασμένο έδαφος από το βαρέο μέταλλο αντιμόνιο. Επιπλέον, θα γίνει και μια βιβλιογραφική αναφορά μελετώντας άλλες έρευνες που ανακάλυψαν βακτήρια ικανά για την οξειδωση και αναγωγή του αντιμονίου. Ταυτόχρονα θα αναλυθεί θεωρητικά ο τρόπος λειτουργίας των μικροοργανισμών να αποδομούν το αντιμόνιο, η σημασία της ύπαρξης ιόντων όπως είναι του σιδήρου(Fe), μαγγανίου(Mn) και μαγνησίου(Mg), της τιμής του pH αλλά και των δοτών ηλεκτρονίων (sodium lactate και γλυκόζη) για την αποκατάσταση των ρυπασμένων περιοχών από αντιμόνιο.

Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε η τεχνολογία της βιοεξυγίανσης ως μέθοδος αποκατάστασης, η οποία αποτελεί μια βιολογική διεργασία. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ως μικροοργανισμοί τα βακτήρια καθώς διαθέτουν ένα πολυποίκιλο μεταβολικό μονοπάτι. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι ο βακτηριακός μεταβολισμός διαθέτει μια χημική ποικιλομορφία των οξειδώσεων και των αντιδράσεων αφομοίωσης του υποστρώματος. Επιπλέον, ένας άλλος λόγος που επιλέχθηκαν τα βακτήρια ως το μέσο βιοεξυγίανσης είναι το γεγονός ότι τα βακτηριακά κύτταρα είναι εξαιρετικά εξειδικευμένοι μετασχηματιστές ενέργειας.

6.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν αρχικά να ερευνηθεί αν υπήρχαν βακτήρια ικανά να επιζήσουν σε περιβάλλον παρουσία αντιμονίου (Sb), σε δεύτερο στάδιο αν υπήρχαν στελέχη βακτηρίων ικανά να μειώσουν την συνολική συγκέντρωση αντιμονίου και σε τρίτο αν υπήρχαν στελέχη ικανά να μετατρέψουν την μορφή Sb(III) σε Sb(V) που είναι λιγότερο τοξική. Η δειγματοληψία των βακτηριακών στελεχών προήλθε από εδάφη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων από πεδίο βολής στην Ελβετία.

6.2. Υλικά και μέθοδοι

Αρχικά, παρουσιάζονται παρακάτω συνοπτικά τα στάδια ανάπτυξης της εργασίας

- Έναρξη 1^{ου} κύκλου Sb στο χώμα -- > προσθήκη 1 gr από κάθε τύπο χώματος σε 100 mL dh20, το οποίο περιείχε τρυγικό κάλιο αντιμονίου σε αρχική συγκέντρωση 50 mg /L. και επώαστηκε στους 28 °C, στο σκοτάδι.
- Πραγματοποίηση 3 διαφορετικών αραιώσεων της τάξης 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} για την απομόνωση από οικογένειες σε μια κοινότητα και σε στελέχη βακτηρίων.
- Τα ανθεκτικά στελέχη βακτηρίων εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό μέσο CDM-A και ενίστε LB που περιείχαν 200 mg/L Sb(III) και τα δείγματα ελήφθησαν καθημερινώς σε κύκλο 7 ημερών για τον εντοπισμό των βακτηρίων που οξειδώνουν το Sb(III).
- Καθημερινή μέτρηση pH κατά την διάρκεια του 7ήμερου κύκλου.

- Μέτρηση συνολικής συγκέντρωσης Sb με την μέθοδο Φασματομετρία Μάζας σε Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα Αργού ICP-MS.
- Ποιοτική συγκέντρωση Sb(III) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο KMnO_4 (υπερμαγγανικό κάλιο).
- Απαρίθμηση της συγκέντρωσης των κυττάρων χρησιμοποιώντας κυτταρόμετρο.

Τα χημικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των 2 θρεπτικών (Χημικά καθορισμένο μέσο λύσης A (Chemically defined medium solution A /CDM-A) και Luria-Bertani(LB)).

Για το θρεπτικό μέσο CDM-A και το LB

χρησιμοποιήθηκαν οι χημικές ενώσεις όπως φαίνεται και από τον πίνακα 4 παρακάτω.

Σε τελικό όγκο τα 1000 mL.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.Χημικά υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των θρεπτικών.

CDM-A	Luria-Bertani/LB	
1. 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g	Tryptone
2. 1 g NH_4Cl	10 g	NaCl
3. 1 g Na_2SO_4	5 g	yeast
4. 13 mg $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$		
5. 67 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		
6. 5 g sodium lactate (άλας νατρίου του γαλακτικού οξέος)		

Σημείωση : Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι σε κάποια πειράματα έγινε η αντικατάσταση του sodium lactate με την γλυκόζη για να βρεθεί πιθανή επίπτωση στην απομάκρυνση του αντιμονίου.

Βαρέα μέταλλα :

Το Sb (III) προστέθηκε ως Potassium antimonyl tartrate trihydrate- $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

Χημικές ενώσεις :

- Άγαρ
- Αιθανόλη
- Γλουταραλδεϋδη
- Γλυκερόλη
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

- KMnO_4
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- NaCl
- NaOH
- Na_2SO_4
- NH_4Cl
- sodium lactate (άλας νατρίου του γαλακτικού οξέος)
- Tryptone
- Yeast

Εργαστηριακός εξοπλισμός :

- Αναδευτήρας –Τράπεζα ανάδευσης
- Αναδευτήρας στροβιλισμού – Vortex
- Απαγωγός
- Ζυγοί Ακριβείας (0,1gr/ 0,01gr/ 0,001gr)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS
- Φούρνος Ξήρανσης
- Φυγόκεντρος Διαχωριστής
- Κυτταρόμετρο
- Ψυγεία εργαστηριακά συντήρησης
- Πολύμετρο
- Φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος / ICP-MS

ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ :

- Αλουμινόχαρτο
- Γάντια μιας χρήσης (νιτριλίου-latex με πούδρα)
- Χαρτί
- Γκαζάκι
- Πλαστικά σακουλακια
- Χαρτοταινία
- Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός
- Υδροβολείς πλαστικοί
- Ρύγχη πιπετών
- Τριβλία Petri
- Parafilm

- Πουάρ πιπέτας
- Πιπέτες μετρήσεως πλαστικές
- Falcon 15 ml και 50 ml
- Eppendorf
- Κύλινδροι ογκομετρικοί πλαστικοί και γυάλινοι
- Ποτήρια ζέσεως
- Γυάλινα φιαλίδια φασματοφωτόμετρου
- Λαβίδες και σπάτουλες
- Ογκομετρικές φιάλες
- Φιάλες κωνικές γυάλινες
- Θερμομονωτικά γάντια
- Γυάλινες πιπέτες μετρήσεως
- Κρίκος εμβολιασμού

6.3. Προετοιμασία πειράματος

Η συλλογή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα προήλθαν από ένα πεδίο βολής στην Ελβετία. Ακολούθησε η αποθήκευση τους σε πλαστικές συσκευασίες σε μέρος απουσίας φωτός.

Τα εδάφη ήταν ρυπασμένα με αντιμόνιο με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις, όπως φαίνεται παρακάτω :

Έδαφος A - soil A: 36.2 mg/kg

Έδαφος B - soil B: 15.5 mg/kg

Έδαφος C - soil C: 3.77 mg/kg

Κύκλος A -Αντιμόνιο στο έδαφος - (Sb in soil)

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με την προσθήκη 1 gr εδάφους από το καθένα από τα τρία εδάφη διαφορετικής συγκέντρωσης αντιμονίου (A, B, C) σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250 mL. Για την κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 2 φλάσκες

Δηλαδή :

Χώμα A → προσθήκη 1 gr σε φλάσκες A1 A2

Χώμα B → προσθήκη 1 gr σε φλάσκες B1 B2

Χώμα C → προσθήκη 1 gr σε φλάσκες C1 C2

Στον κύκλο A (Sb in soil), κάθε γυάλινη φιάλη περιείχε αποστειρωμένο θρεπτικό CDM-A, 50 mg/L Sb(III) και 1 gr έδαφος. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε τράπεζα ανάδευσης για 2 μέρες. Το αποστειρωμένο θρεπτικό CDM-A που προστέθηκε είχε pH = 7.22.

Δημιουργία Αβιοτικού ελέγχου

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε φλάσκα αβιοτικού ελέγχου, όπου 1 gr εδάφους προστέθηκε σε 100 mL θρεπτικό CDM-A και έπειτα το σύστημα αποστειρώθηκε για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών. Ο αβιοτικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο επιμόλυνσης και διακύμανσης της τιμής του pH.

Δημιουργία stock Sb(III)

Αρχικά, σχηματίστηκε stock τρισθενές αντιμονίου(III) τελικής συγκέντρωσης 500 mg/L. Ωστόσο, στην διάρκεια των πειραμάτων από μετρήσεις ICP-MS, η συγκέντρωση του ήταν 2400 mg/L. Για τον σχηματισμό του πυκνού διαλύματος Sb(III), σε τελικό όγκο 100 mL dH₂O (απιονισμένου νερού) και τελικής συγκέντρωσης 500 mg/L, γινόταν με την προσθήκη ποσότητας 0.326 gr C₈H₄K₂O₁₂Sb₂·3H₂O.

Κάθε φορά ανάλογα η επιθυμητή τελική συγκέντρωση αντιμονίου για το θρεπτικό υπολογιζόταν με τον τύπο της αραιώσης $C_1V_1=C_2V_2$. Ο πρώτος κύκλος χαρακτηρίστηκε από χαμηλή συγκέντρωση Sb(III) 50 mg/L σε σχέση με την συνέχεια που έφτασε ως και 240 mg/L.

- Για τελικό όγκο $V_2= 100$ ml,
- C_1 = συγκέντρωση πυκνού διαλύματος stock Sb (500 mg/L).
- C_2 = τελική επιθυμητή συγκέντρωση Sb (50 mg/L).
υπολογίστηκε ο αρχικός όγκος Sb που πρέπει να προστεθεί στα 100 mL μαζί με το θρεπτικό CDM-A και το χρώμα.

$$\text{Άρα } V_1 = \frac{V_2 \cdot C_2}{C_1} = \frac{50 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cdot 100 \text{ mL}}{500 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} = 10 \text{ mL Sb(III)}.$$

1^η Ανακαλλιέργεια Εμπλουτισμού

Μετά το πέρας του κύκλου A, ξεκίνησε ο κύκλος B.

Για την ανακαλλιέργεια συλλεγόταν 5 ml από κάθε φλάσκα του προηγούμενου κύκλου και προστέθηκαν σε 100 ml θρεπτικού CDM-A και 50 mg/L Sb(III).

Έγινε παραγωγή καινούριου stock Sb(III) συνολικής συγκέντρωσης 1000 mg /L.

Για να βρεθεί ο αρχικός όγκος του Sb που θα έπρεπε να προστεθεί στο θρεπτικό, ακολουθήσαμε τον τύπο της αραιώσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

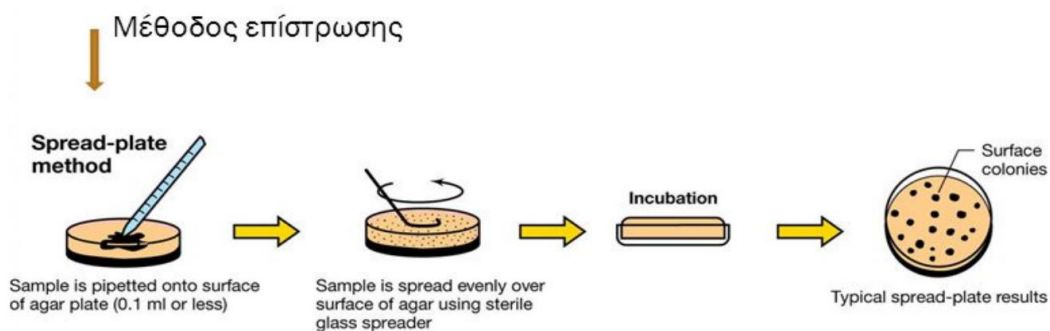
$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \rightarrow V_1 = (50 \text{ mg/L} \cdot 720 \text{ mL}) / 1000 \text{ mg/L} \rightarrow$$

$V_1 = 36 \text{ mL Sb (III)}$ σε συνολικό όγκο 720 mL. Άρα η ποσότητα απιονισμένου νερού που έπρεπε να προστεθεί ήταν $720 \text{ mL} - 36 \text{ mL Sb (III)} = 684 \text{ mL dH}_2\text{O}$.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε άλλη μία φορά.

6.4. Απομόνωση βακτηριακών στελεχών

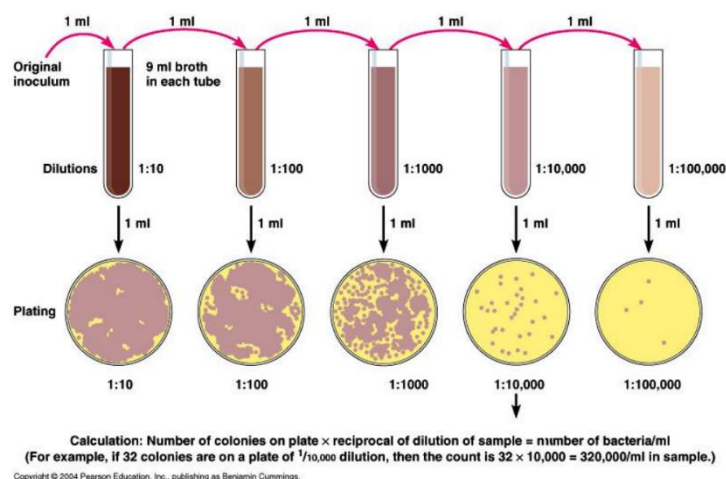
Για την απομόνωση των βακτηριακών στελεχών από τα δείγματα που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε η τεχνική της επίστρωσης σε στερεό θρεπτικό άγαρ (εικόνα 14). Παράλληλα ήταν απαραίτητη η αραιώση των δειγμάτων καθώς τα κύτταρα σε αυτά υπήρχαν σε πολύ υψηλή συγκέντρωση. Η αραιώση ουσιαστικά πραγματοποιείται ώστε να γίνει καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς των στελεχών που είναι ικανά για την οξείδωση του αντιμονίου. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και από την εικόνα 15, 1 mL από την αρχική υγρή καλλιέργεια προστέθηκε σε 9 mL 0.85% w/v αποστειρωμένου NaCl και διαδοχικά δημιουργήθηκαν οι υπόλοιπες αραιώσεις (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}). Κάθε φορά γινόταν επίστρωση της επιθυμητής συγκέντρωσης στο τριβλίο, το οποίο περιείχε στερεό θρεπτικό CDM-A. Ακολούθησε η επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για περίπου 3 ημέρες. Η διαδικασία της επίστρωσης πραγματοποιήθηκε 3 φορές μέχρι την πλήρη απομόνωση των βακτηριακών στελεχών.



ΕΙΚΟΝΑ 15. Η μέθοδος της επίστρωσης σε στερεό θρεπτικό άγαρ.

Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Επειδή κάθε καλλιέργεια μικροοργανισμών μπορεί να περιέχει από χίλια έως εκατοντάδες εκατομμύρια βακτηριακά κύτταρα ανά όγκο, ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου χρειάζεται μια διαδικασία διαχωρισμού των βακτηρίων, ώστε όταν καλλιεργηθούν σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό, να σχηματίζουν μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι κάθε ζωντανό κύτταρο αναπτύσσει αποικίες σε κατάλληλες συνθήκες.



ΕΙΚΟΝΑ 16.Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.

Μετά το πέρας της απομόνωσης επιλέχθηκε από κάθε τριβλίο μια απομονωμένη αποικία και προστέθηκε σε 10 ml αποστειρωμένο θρεπτικό CDM-A με 50 mg/L Sb(III) σε φάλκονς των 15 ml και ακολούθησε ανάδευση σε τράπεζα ανάδευσης (120 rpm σε θερμοκρασία 25 °C στο σκοτάδι). Όταν αναπτύχθηκε ο πληθυσμός προστέθηκαν 80 μ L γλυκερόλης και τοποθετήθηκε στους -80 °C. Συνολικά από τα τρυβλία του κάθε δείγματος επιλέχθηκαν συνολικά 27 αποικίες και μία κοινότητα, τα οποία αποτελούσαν τα προς μελέτη δείγματα.



Εικόνα 17. Στελέχη βακτηρίων σε γλυκερόλη.

Πριν την έναρξη κάθε κύκλου μελέτης ενός στελέχους γίνεται η προεπώαση. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει, την επιλογή του επιθυμητού προς μελέτη στελέχους από τα stock γλυκερόλης μαζί με την προσθήκη 8 mL αποστειρωμένου θρεπτικού CDM-A σε falcon των 15 mL. Ύστερα οδηγούνται προς ανάδευση σε τράπεζα ανάδευσης (120 rpm, σε θερμοκρασία 25 °C, στο σκοτάδι). Με την ανάπτυξη του στελέχους, ο πληθυσμός μεταφέρεται σε αποστειρωμένη φλάσκα (εις τριπλούν) σε τράπεζα ανάδευσης με τις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω για 7 ημέρες. Ο τελικός όγκος κάθε υγρής καλλιέργειας ήταν 100 mL και Sb(III) τελικής

συγκέντρωσης 240 mg/L. Ο αβιοτικός έλεγχος χωρίς την προσθήκη μικροοργανισμών πραγματοποιείται παράλληλα με τις ίδιες συνθήκες. Το pH προσαρμόστηκε στην τιμή του 7 (Prakash C. Loni et al., 2020).

6.5. Δειγματοληψία

- Η δειγματοληψία περιλαμβάνει την καθημερινή απομάκρυνση 5 mL από κάθε φλάσκα. Από τα 5 ml, τα 3 ml προστίθενται σε φάλλονες των 15 ml για την μέτρηση του pH με το πολύμετρο και ύστερα φυγοκεντρούνται. Στο υπερκείμενο γινόταν η μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης αντιμονίου με την μέθοδο ICP-MS.
- Το 1 ml από τα 5 ml, τοποθετείται στο ψυγείο για 1 ώρα μαζί με την προσθήκη 80 μ l γλουταραλδεϋδης και έπειτα στην κατάψυξη.
- Το υπόλοιπο 1ml προστίθεται σε γυάλινα φιαλίδια με την προσθήκη 30 μ l υπερμαγγανικού καλίου – KMnO_4 .

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε διάστημα 7 ημερών.

Το υπερμαγγανικό κάλιο (KMnO_4) είναι μια ανόργανη χημική ένωση. Χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό προσδιορισμό της μετατροπής του Sb (III) σε Sb(V).

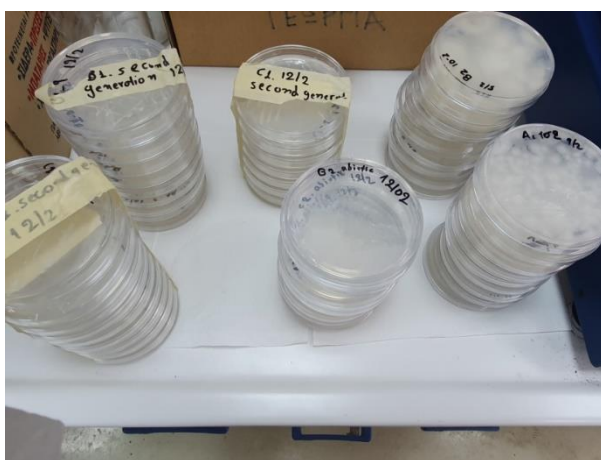
- Η παρουσία ροζ χρώματος στο διάλυμα υποδεικνύει τη μείωση της συγκέντρωσης του Sb(III) στην υγρή φάση της καλλιέργειας. Με κριτήριο τη συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου προτείνεται είτε η μείωση του αντιμονίου στην υγρή φάση είτε η μετατροπή του σε Sb(V), καθώς αυτό δεν αντιδρά με το KMnO_4 . Αντιθέτως, η παρουσία ενός πορτοκαλί ή διαυγές χρώματος υποδεικνύει την παρουσία Sb (III).



ΕΙΚΟΝΑ 18 Α,Β Υγρή καλλιέργεια απομονωμένων στελεχών



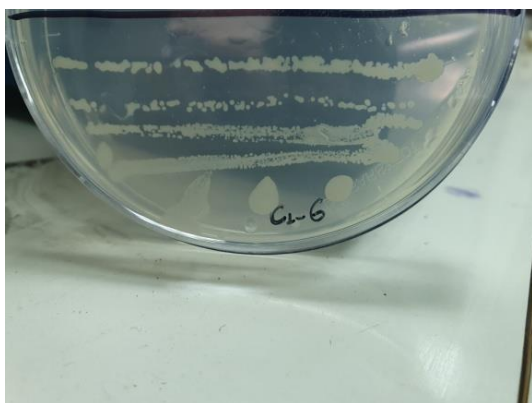
EIKONA 19 Το υπερμαγγανικό κάλιο (KMnO_4) αποθηκευμένο σε falcon των 15 ml.



EIKONA 20 Διαδικασία απομόνωσης των στελεχών.



EIKONA 21 Κύτταρο C1 μετά από αραίωση 10^{-4}



ΕΙΚΟΝΑ 22.Αποικίες του κυττάρου C1_6, μετά από επίστρωση σε τρυβλίο με άγαρ.

6.6. Αποτελέσματα

Παρακάτω παρουσιάζεται η αλλαγή του pH όπως παρατηρήθηκε από τον πρώτο κύκλο μελέτης – Αντιμόνιο στο έδαφος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Η τιμή του pH του κύκλου Α -αντιμόνιο στο χώμα.

	DAY 0	DAY 1
A1	8.29	8.17
A2	8.3	8.24
B1	8.64	8.46
B2	8.6	8.51
C1	8.58	8.49
C2	8.58	8.47

Η τιμή του pH του εδάφους, την ημέρα έναρξης του πρώτου κύκλου ήταν 7-7.5, καθώς και του αποστειρωμένου θρεπτικού που προστέθηκε ήταν 7.22. Μετά από ανάδευση στην τράπεζα ανάδευσης (εικόνα 21) και εκ νέου υπολογισμού της τιμής του pH, παρουσιάστηκε αύξηση στην τιμή του pH. Επιπλέον, όπως παρατηρείται από το παραπάνω πίνακα υπάρχει μείωση στην τιμή του pH, ανάμεσα στην πρώτη και δεύτερη ημέρα του κύκλου γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία μικροοργανισμών ή την αντίδραση με κάτι που υπάρχει στο έδαφος.

Παρακάτω παρουσιάζεται εικόνα από την Ημέρα 1 ανάδευσης του κύκλου Α.



ΕΙΚΟΝΑ 23.0 κύκλος A-αντιμόνιο στο έδαφος σε τράπεζα ανάδευσης.

Πίνακας 6. Τιμές pH από τον κύκλο B, αβιοτικού και βιοτικού παράγοντα.

	DAY 0 Cycle-B Soil Microorganisms CDM-A +50 mg/L Sb (III)	DAY4	DAY 0 OF ABIOTIC CONTROL Soil+CDM-A+ 50 mg/L Sb (III)	DAY 4	DAY 7
A1	6.53	8.68	8.86	8.79	8.76
A2	6.31	8.71	8.85	8.71	8.74
B1	6.54	8.85	8.82	8.86	8.81
B2	6.76	8.63	8.83	8.80	8.76
C1	7.06	9.63	8.70	8.77	8.74
C2	6.59	8.65	8.59	8.78	8.79

Από τον παραπάνω πίνακα, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η τιμή του pH του βιοτικού παρουσίασε μεγάλη αύξηση την πρώτη ημέρα σε σχέση με την τέταρτη, σε αντίθεση με την τιμή του pH του αβιοτικού που παρέμεινε σταθερή κατά την διάρκεια του 7ήμερου κύκλου μελέτης. Η αποστείρωση του θρεπτικού CDM-A που προστέθηκε στον αβιοτικό έλεγχο είχε ως αποτέλεσμα την απουσία ανάπτυξης των μικροοργανισμών που βρίσκονταν στο έδαφος.

Από το έδαφος A δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος ή κοινότητα καθώς κανένα από τα πιθανά ανθεκτικά βακτήρια δεν αναπτύχθηκε στο στερεό υπόστρωμα. Επιπλέον, το B2 αποτελεί κοινότητα και κατά την διάρκεια της υγρής ανακαλλιέργειας παρουσίασε ανθεκτικότητα υπό την παρουσία του Sb(III).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται όλοι οι κύκλοι των στελεχών βακτηρίων και της μίας κοινότητας (κοινότητα B2), που μελετήθηκαν σε συνολικό διάστημα 1 χρόνου. Κάποια από τα στελέχη που είχαν απομονωθεί, δε μεγάλωσαν στο θρεπτικό και έτσι δεν πραγματοποιήθηκαν

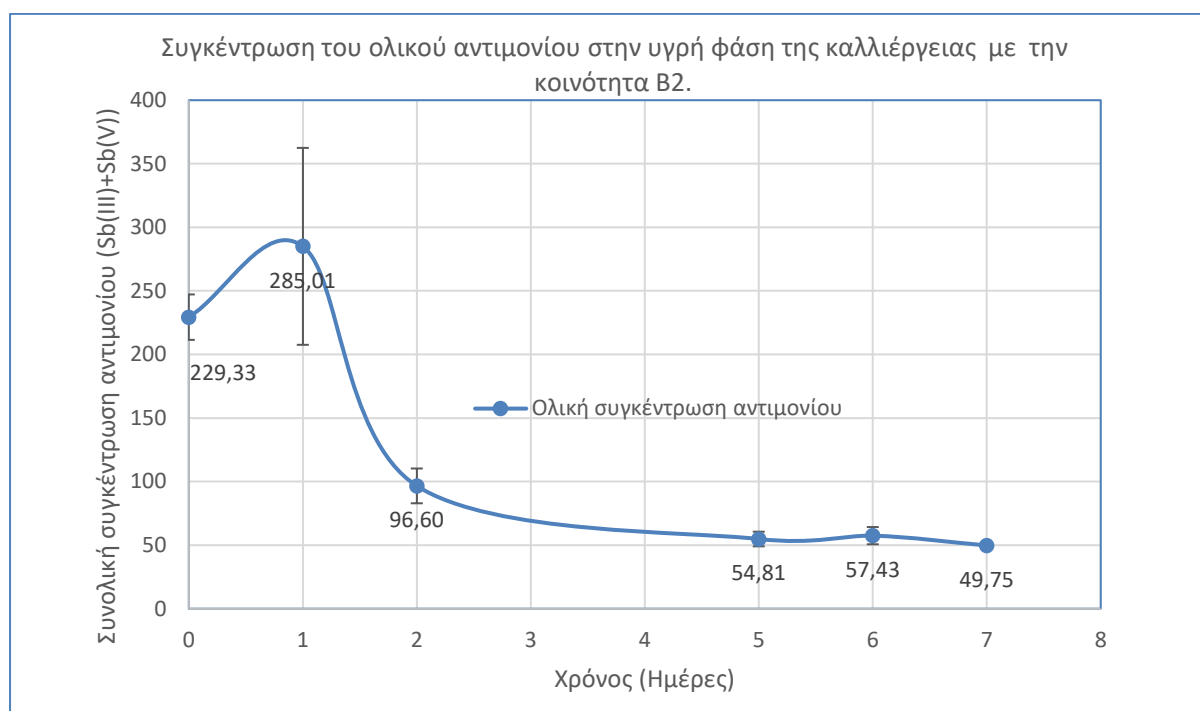
τα τεστ για την μελέτη της ικανότητας της οξειδωσης του Sb(III). Η κοινότητα B2 και άλλα 19 βακτηριακά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από το έδαφος βρέθηκαν ικανά να αναπτύσσονται υπό την παρουσία 200 mg/L συγκέντρωσης Sb(III). Ανάμεσα σε αυτά η κοινότητα B2 και τα στελέχη C1_6, B1_5 βρέθηκαν ικανά να οξειδώνουν το Sb (III) σε Sb(V). Τα αποτελέσματα των οποίων παρατίθενται παρακάτω αναλυτικά.

Πίνακας 7. Οι κύκλοι των βακτηριακών στελεχών και της κοινότητας B2 που μελετήθηκαν σε διάστημα 1 χρόνου.

ΕΔΑΦΟΣ		MEDIA- ΘΡΕΠΤΙΚΟ
B	B2 COMMUNITY	CDM-A με λακτόζη
	B1_5	CDM-A <<
	B1_4	LB
	B1_8	LB
	B1_5	CDM-A με γλυκόζη
	B1_6	<<
	B1_2	<<
	B1_7	<<
	B2- COMMUNITY	<<
	B1_3	<<
	B1_3	<<
C	C1_6	CDM-A με λακτόζη
	C1_2	LB
	C1_1	LB
	C1_2	CDM-A με γλυκόζη
	C1_1	<<
	C1_5	<<
	C1_9	<<
	C2_9	<<
	C2_3	<<
	C2_2	<<

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα pH συναρτήσει του χρόνου καθώς και του ολικού Sb συναρτήσει του χρόνου. Παράλληλα τα αποτελέσματα από τον ποιοτικό προσδιορισμό της οξειδωσης του Sb(III).

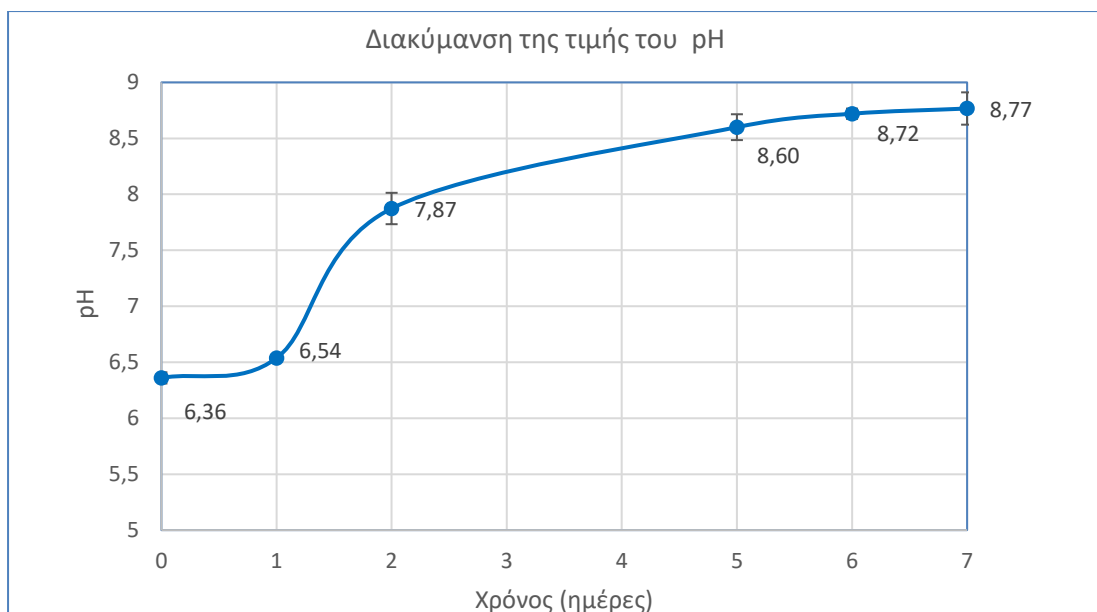
Ανθεκτικότητα κοινότητας B2 στο αντιμόνιο



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με την κοινότητα B2.

Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

Στο παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι μέσα σε 72 ώρες η κοινότητα B2 μπόρεσε να μειώσει το ολικό αντιμόνιο υπό αερόβιες συνθήκες. Συνολικά, στην διάρκεια μελέτης ενός 7ήμερου κύκλου η μείωση του ολικού αντιμονίου ήταν της τάξης 78.31%. Πιθανώς η δεύτερη μέτρηση που είναι 285.01 mg/L να είναι πιο υψηλή από την προηγούμενη από λάθος που έγινε κατά την διαδικασία της δειγματοληψίας ή το δείγμα συλλέχθηκε χωρίς να γίνει καλή ανάδευση. Επιπλέον, το θρεπτικό στο οποίο αναπτύχθηκε η κοινότητα B2 περιείχε ως δότη ηλεκτρονίων το sodium lactate.



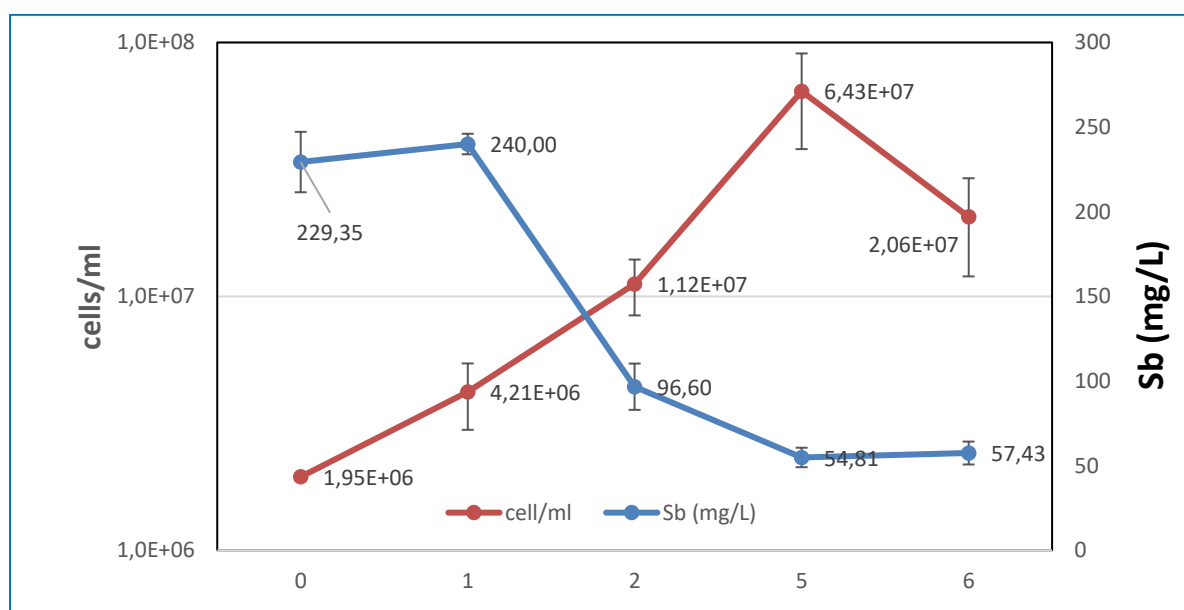
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2. Η διακύμανση της τιμής του pH, όπως παρατηρήθηκε σε ένα κύκλο 7 ημερών με την κοινότητα B2. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση ($n=3$).

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται αύξηση της τιμής του pH με αρχική τιμή 6.36 και τελική 8.77 στην υγρή καλλιέργεια της κοινότητας B2 με sodium lactate. Επιπλέον, σε συνδυασμό με το διάγραμμα 1, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι ουδέτερες με αλκαλικές συνθήκες ενίσχυσαν την μείωση του ολικού αντιμονίου. Η έρευνα των Prakash C.Loni et al.(2020), οδήγησε στο ίδιο συμπέρασμα. Η κοινότητα B2, έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και να μειώνει την ολική συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου σύμφωνα με το διαγράμματα 1, αλλά και με μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο κυτταρόμετρο τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω στο διάγραμμα 3. Ταυτόχρονα με τις μετρήσεις των Sb, pH συναρτήσει του χρόνου πραγματοποιήθηκε και ο ποιοτικός προσδιορισμός με το KMnO_4 της οξείδωσης του Sb(III) από την κοινότητα B2.



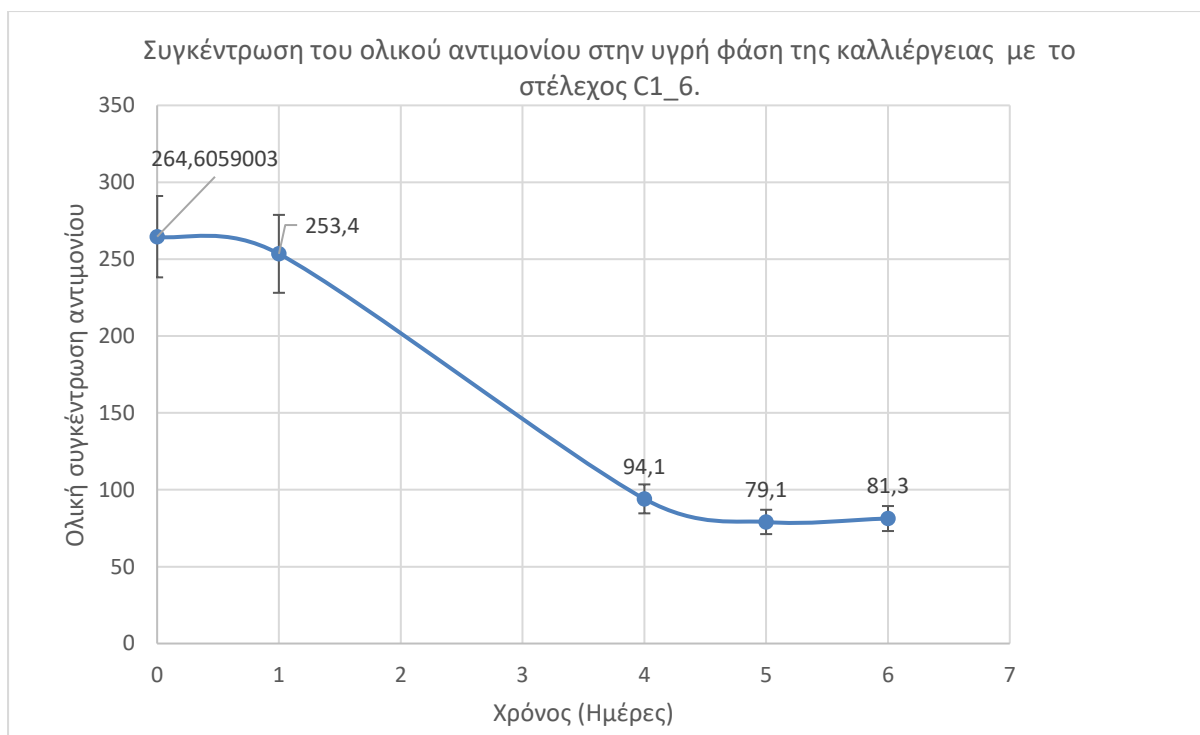
ΕΙΚΟΝΑ 24 Ποιοτικός έλεγχος της παρουσίας Sb(III) στην υγρή φάση της καλλιέργειας κατά την διάρκεια του πειράματος.

Η παραπάνω εικόνα αποτελεί στιγμιότυπο από την διαδικασία της ποιοτικής μέτρησης της μείωσης του Sb(III) με το KMnO_4 . Όπως διακρίνεται παραπάνω, η παρουσία ροζ χρώματος στο διάλυμα από την 2ημέρα του κύκλου και έπειτα υποδεικνύει τη μείωση της συγκέντρωσης του Sb(III) στην υγρή φάση της καλλιέργειας. Δεδομένου ότι το Sb(V) δεν αντιδρά με το KMnO_4 , καθώς και το διάγραμμα της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου παρουσίασε μείωση από την 2 ημέρα και έπειτα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η κοινότητα B2 είναι ικανή για οξείδωση του Sb(III) και μετατροπή σε Sb(V). Αυτό, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο αποτελεί μηχανισμό των βακτηρίων για την αποτοξικοποίηση από το Sb(III).



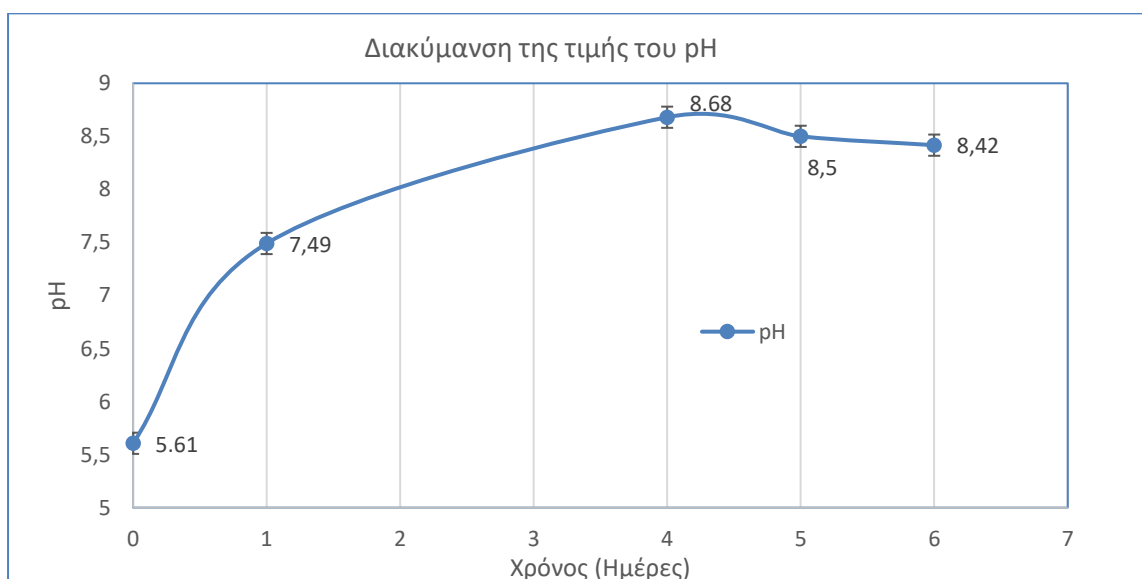
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3. Καμπύλη ανάπτυξης της κοινότητας B2 που απομονώθηκε από το δείγμα B, συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι με την αύξηση των κυττάρων της κοινότητας B2, στην υγρή καλλιέργεια μετά την 2 ημέρα του κύκλου παρουσιάζεται και ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Διακρίνεται ότι η κοινότητα B2 τις πρώτες 24 ώρες παρουσιάζει εκθετική ανάπτυξη μέχρι και την 5 ημέρα, η οποία έχει τον μέγιστο αριθμό κυττάρων. Επιπλέον, στο μέγιστο της ανάπτυξης της κοινότητας B2, η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου παρουσιάζει πτώση της τάξεως 76 %. Παρατηρείται επιπλέον, ότι με την μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου, παρουσιάζει μείωση και ο αριθμός των κυττάρων από $6,43 \times 10^7$ σε $2,06 \times 10^6$. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η κοινότητα B2 μπορεί να αναπτύσσεται σε τοξικό περιβάλλον που επιφέρει το ιόν τρισθενές αντιμονίου αλλά και να αναπτύσσει μηχανισμούς αποτοξικοποίησης, όπως για παράδειγμα η οξείδωση του Sb(III) σε Sb(V), όπως φαίνεται και από την εικόνα 23 αλλά και η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου ως αποτέλεσμα μικροβιακής ρόφησης.



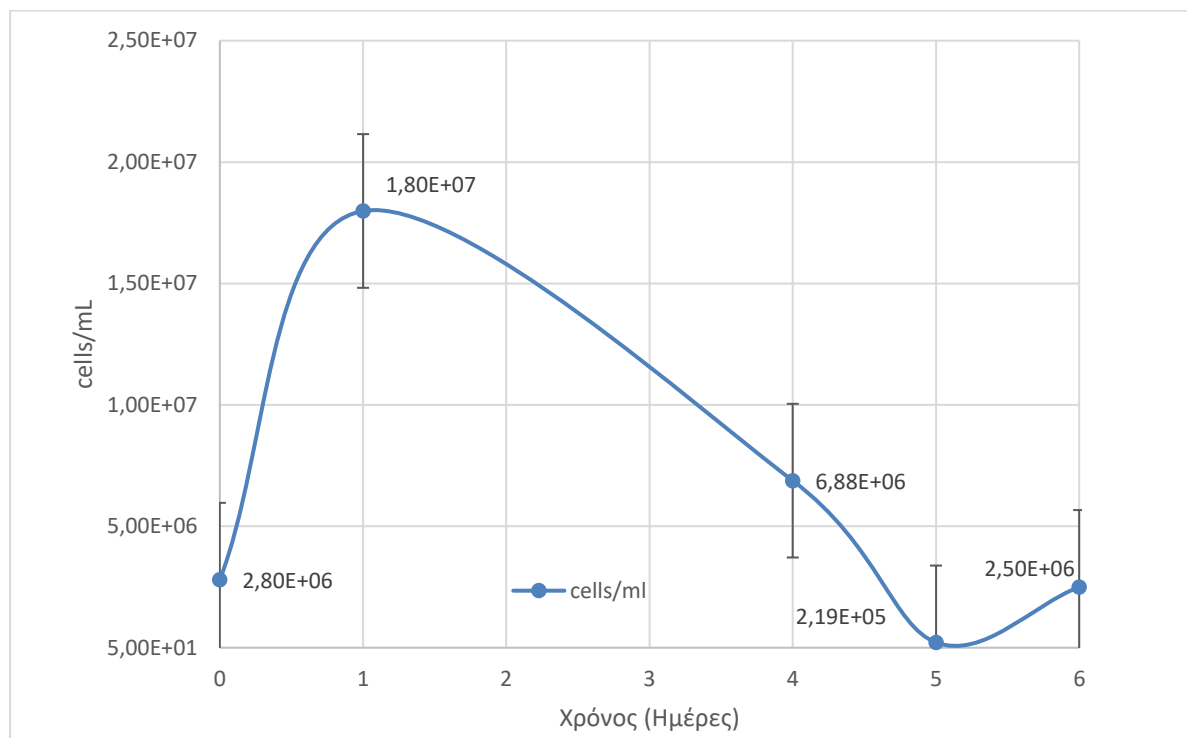
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος C1_6. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

Παρατηρείται η μείωση της ολικής συγκέντρωσης του αντιμονίου με την μέθοδο ICP-MS με την παρουσία στελέχους C1_6. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι μέσα σε 72 ώρες το στέλεχος C1_6 μπόρεσε να μειώσει το ολικό αντιμόνιο υπό αερόβιες συνθήκες, σε ποσοστό της τάξεως του 69 % της αρχικής συγκέντρωσης. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι το βακτηριακό στέλεχος όχι μόνο μπορεί να αναπτυχθεί, αλλά είναι ικανό να μειώσει και την συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5. Η διακύμανση της τιμής του pH, συναρτήσεως του χρόνου με το στέλεχος C1_6. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

Η τιμή του pH αυξήθηκε από την αρχική τιμή 5.61 σε 8.42 στην υγρή καλλιέργεια του στελέχους C1_6 κατά την ανάπτυξη του με sodium lactate. Επιπλέον, σε συνδυασμό με το διάγραμμα 5, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι ουδέτερες με αλκαλικές συνθήκες ενίσχυσαν την μείωση του ολικού αντιμονίου. Η έρευνα των Prakash C.Loni et al.(2020), οδήγησε στο ίδιο συμπέρασμα.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους C1_6, που απομονώθηκε από το δείγμα C, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν το τυπικό σφάλμα.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι κατά την έναρξη του πειράματος ο αριθμός των κυττάρων του στελέχους C1_6 είναι της τάξης του 2.80×10^6 . Πιο αναλυτικά, το στέλεχος C1_6 το οποίο αναπτύχθηκε σε υγρή καλλιέργεια που είχε ως πηγή άνθρακα το sodium lactate το πρώτο 24ώρο παρουσίασε εκθετική ανάπτυξη ενώ στην πορεία παρατηρείται μείωση του αριθμού των κυττάρων με την μικρότερη τιμή να είναι την 5^η ημέρα του πειραματικού κύκλου. Επιπλέον, με την μείωση του αριθμού των κυττάρων παρατηρείται και ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου (διάγραμμα 4). Στο ελάχιστο του αριθμού των κυττάρων του στελέχους C1_6, το οποίο είναι την ημέρα 5^η, υπάρχει απομάκρυνση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου της τάξεως του 69 %. Ωστόσο, την 6^η ημέρα του πειράματος παρατηρείται ότι υπάρχει αύξηση του αριθμού κυττάρων που συμπίπτει και με την ελάχιστη αύξηση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι το κυτταρόμετρο μετράει συνολικά τα κύτταρα είτε ζωντανά είτε όχι, καθώς συνολικά παρατηρείται ότι με την μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου μειώνονται και τα κύτταρα. Με βάση τα παραπάνω αλλά και το διάγραμμα 4, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος C1_6 μπορεί να αναπτύσσεται σε τοξικό περιβάλλον που επιφέρει το ιόν τρισθενές αντιμονίου αλλά ταυτόχρονα να αναπτύσσει μηχανισμούς αποτοξικοποίησης, όπως για παράδειγμα η οξείδωση του Sb(III) σε Sb (V), όπως διακρίνεται και από την εικόνα 25. Παράλληλα, μία έρευνα των

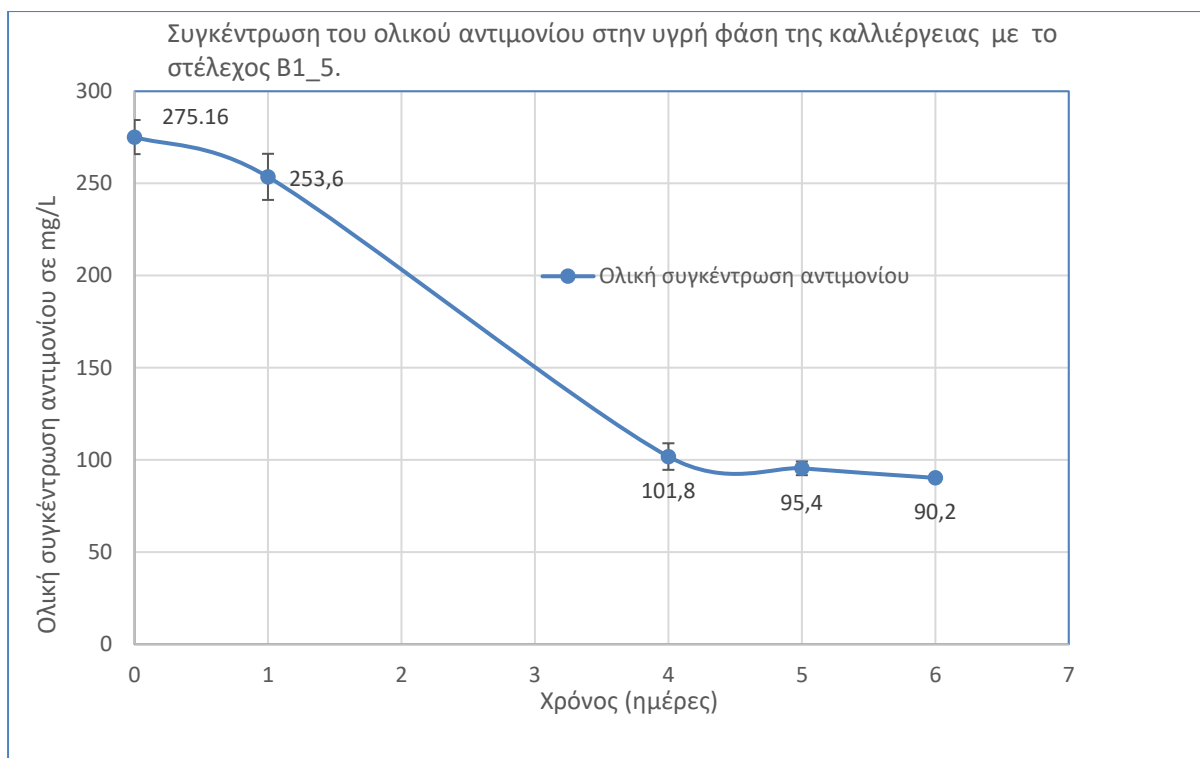
Jingxin Li et al.(2016), βρήκε ότι η οξειδωτική διαδικασία κατά την ετερότροφη ανάπτυξη τους μπορεί να είναι αποτέλεσμα κυτταρικής αποτοξίνωσης.

Ταυτόχρονα με τις μετρήσεις των Sb, pH συναρτήσει του χρόνου πραγματοποιήθηκε και ο ποιοτικός προσδιορισμός με το KMnO_4 της οξείδωσης του Sb(III) από το στέλεχος C1_6.



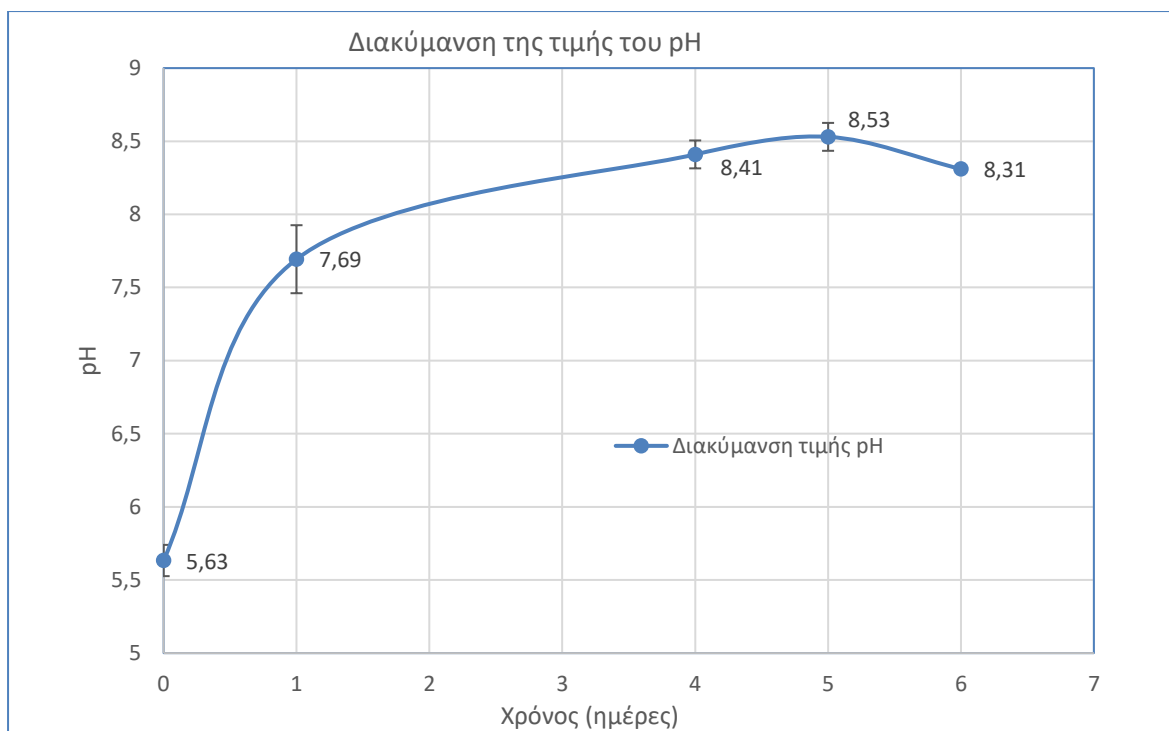
ΕΙΚΟΝΑ 25. Ποιοτικός έλεγχος της παρουσίας Sb(III) στην υγρή φάση της καλλιέργειας κατά την διάρκεια του πειράματος.

Από την παραπάνω εικόνα, παρατηρείται η διαδικασία της ποιοτικής μέτρησης της μείωσης του Sb(III) με το KMnO_4 . Όπως διακρίνεται παραπάνω, η παρουσία του ροζ χρώματος στο διάλυμα από την 4ημέρα του κύκλου και έπειτα υποδεικνύει τη μείωση της συγκέντρωσης του Sb(III) στην υγρή φάση της καλλιέργειας. Δεδομένου ότι το Sb(V) δεν αντιδρά με το KMnO_4 , καθώς και το διάγραμμα της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου παρουσίασε μείωση από την 4 ημέρα και έπειτα προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος C1_6 είναι ικανό για οξείδωση του Sb(III) και μετατροπή σε Sb(V). Αυτό, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο αποτελεί μηχανισμό των βακτηρίων για την αποτοξικοποίηση από το Sb(III).



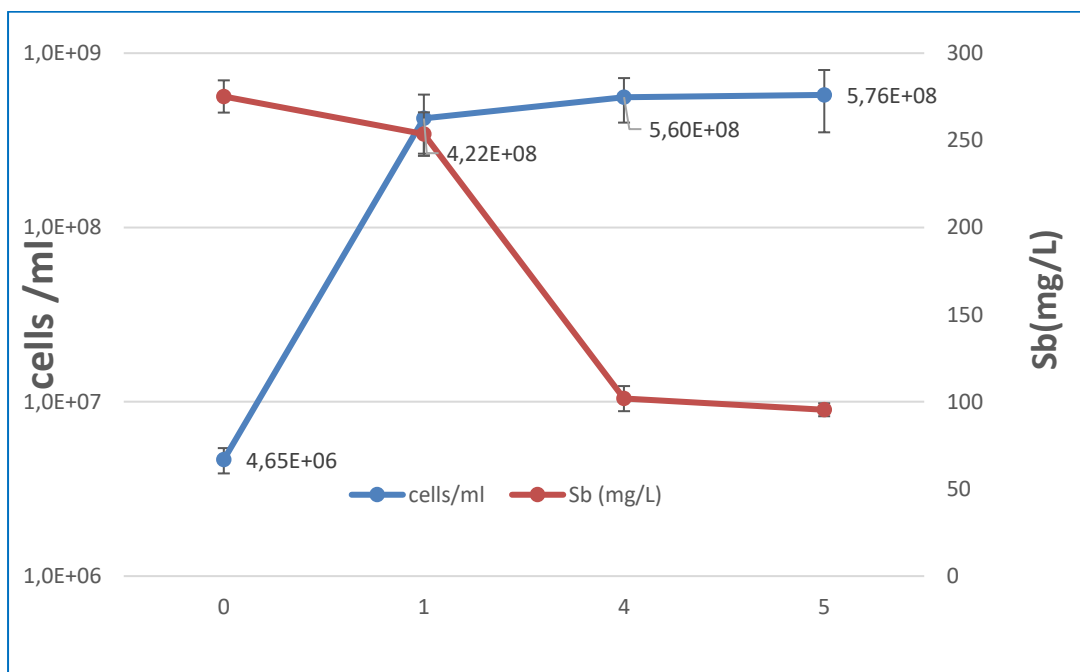
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος B1_5. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου με την μέθοδο ICP-MS. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι μετά την 3ημέρα και έπειτα υπάρχει μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου η οποία φτάνει έως και 68 % της αρχικής συγκέντρωσης. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι το βακτηριακό στέλεχος B1_5 όχι μόνο μπορεί να αναπτυχθεί, αλλά είναι ικανό να μειώσει και την συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου.



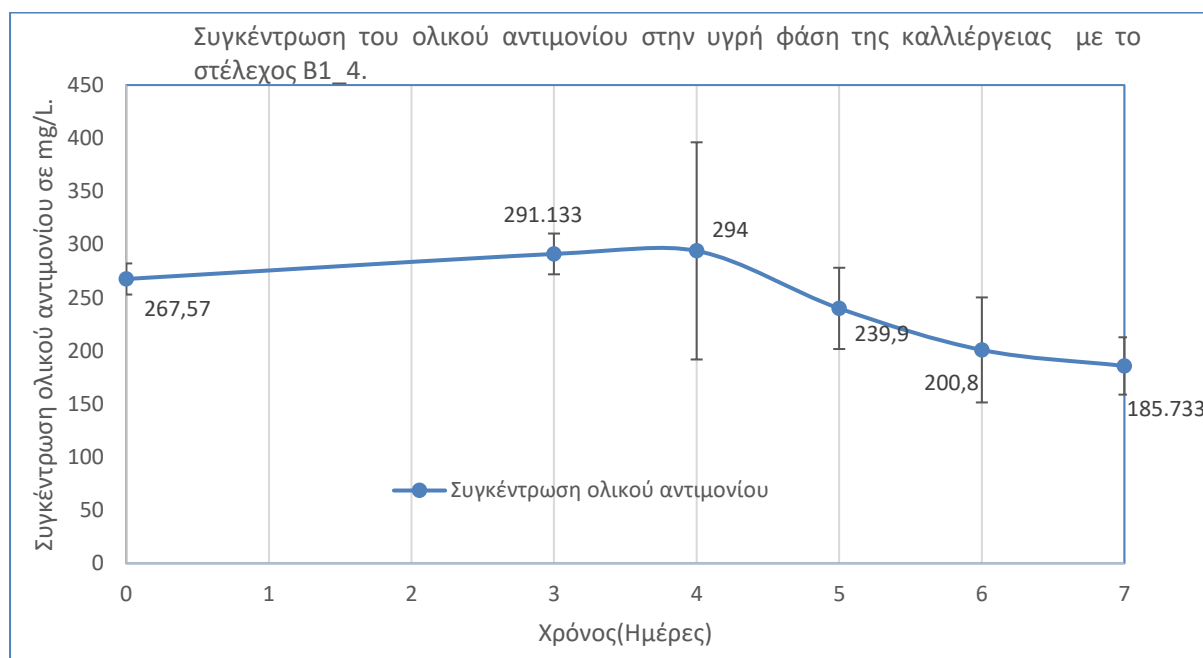
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8. Η διακύμανση της τιμής του pH, συναρτήσει του χρόνου με το στελέχος B1_5. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται αύξηση της τιμής του pH με αρχική τιμή 5.63 και τελική 8.31 στην υγρή καλλιέργεια του στελέχους B1_5, ανάπτυξης με πηγή άνθρακα το sodium lactate. Επιπλέον, σε συνδυασμό με το διάγραμμα 5, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι ουδέτερες με αλκαλικές συνθήκες ενίσχυσαν την μείωση του ολικού αντιμονίου. Η έρευνα των Prakash C.Loni et al.(2020), οδήγησε στο ίδιο συμπέρασμα.



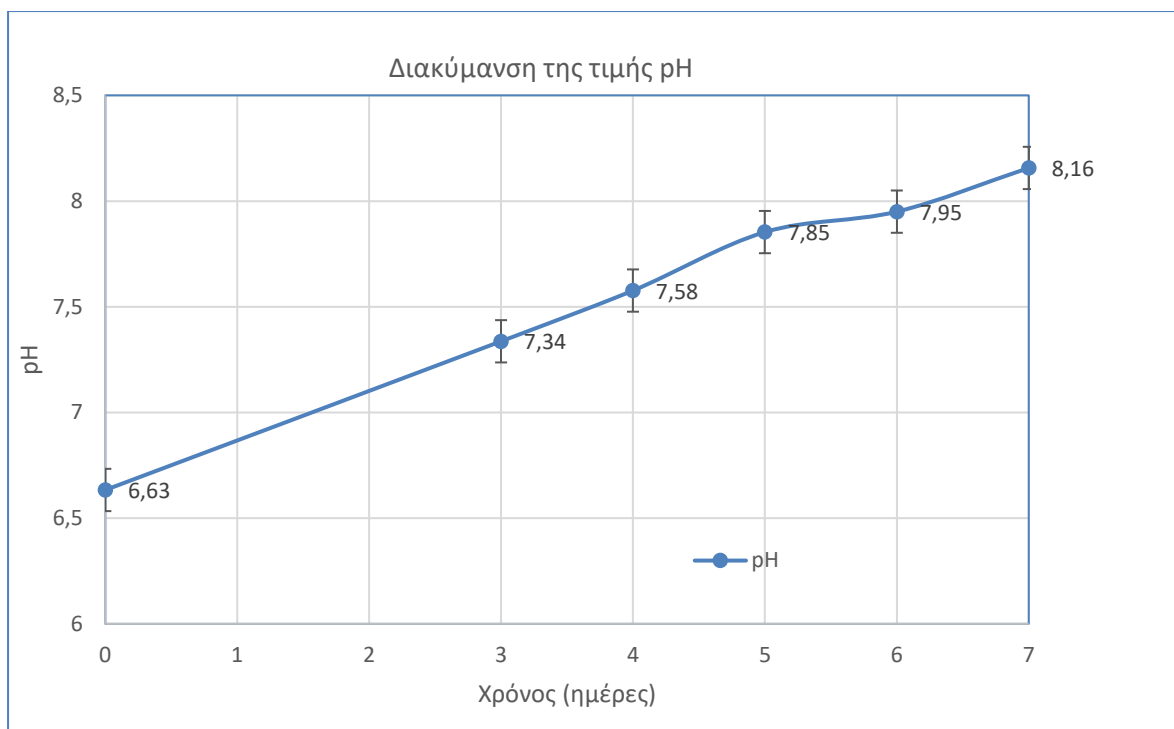
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους B1_5, που απομονώθηκε από το δείγμα B, συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, το στέλεχος με πηγή άνθρακα το sodium lactate παρουσίασε μεγάλο ρυθμό ανάπτυξης. Διακρίνεται ότι το B1_5 στέλεχος τις πρώτες 24 ώρες παρουσιάζει εκθετική ανάπτυξη και έπειτα μια φάση στασιμότητας. Επιπλέον, στο μέγιστο της ανάπτυξης τους, η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου παρουσιάζει πτώση της τάξεως 60 %.



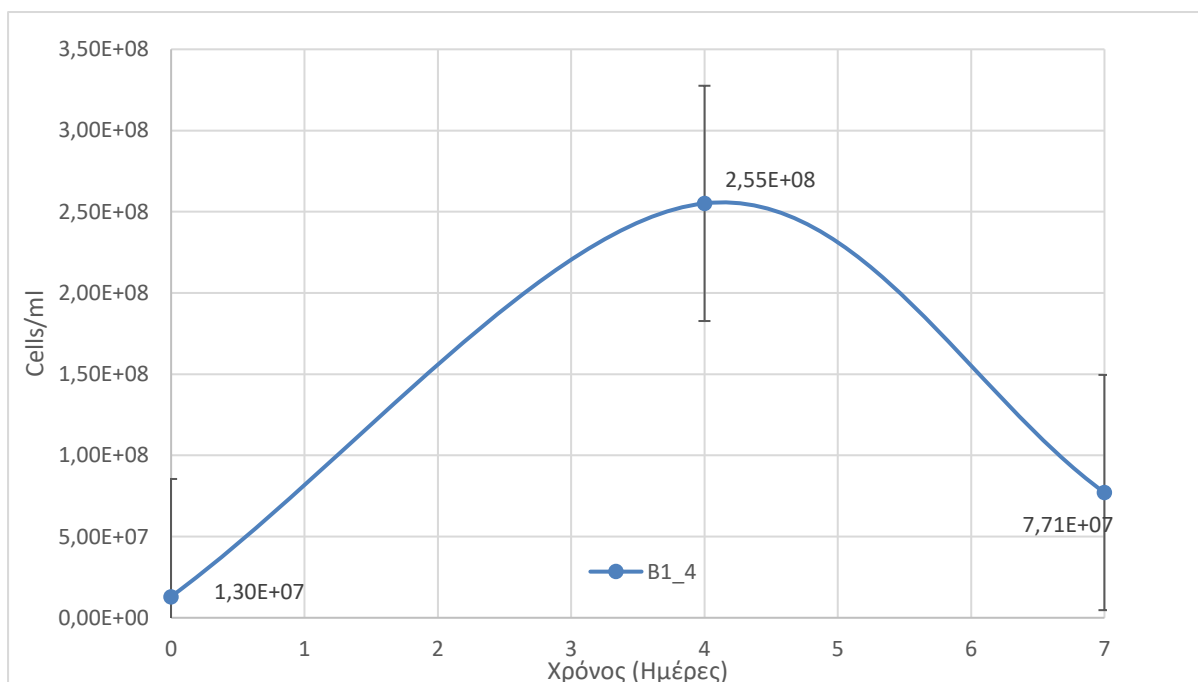
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος B1_4, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου με την μέθοδο ICP-MS με την παρουσία στελέχους B1_4. Για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους χρησιμοποιήθηκε μαγιά ως πηγή άνθρακα. Παρατηρείται ότι η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή των στελεχών C1_6 και B1_5, καθώς η συνολική μείωση ήταν της τάξεως 36 % σε σχέση με την αρχική σε αντίθεση με τα στελέχη C1_6, B1_5 που ήταν 69 % και 68 % αντίστοιχα. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την αλλαγή στην πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε, καθώς από μία έρευνα των Nguyen et al.(2017), η χρήση μαγιάς ως πηγή άνθρακα δεν επέφερε μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης του Sb(III), παρά μόνο στην αύξηση της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων. Επιπλέον, η τιμή 267.57 mg/L πιθανώς να είναι πιο χαμηλή από τις επόμενες από λάθος που έγινε κατά την διαδικασία της δειγματοληψίας ή το δείγμα συλλέχθηκε χωρίς να γίνει καλή ανάδευση. Με βάση όλα τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος B1_4 είναι ικανό να αναπτύσσεται σε θρεπτικό παρουσίας αντιμονίου υψηλής συγκέντρωσης και ταυτόχρονα να μπορεί να μειώνει την αρχική του συγκέντρωση έως 31 %.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11. Διακύμανση της τιμής του pH, συναρτήσει του χρόνου με το στέλεχος B1_4. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

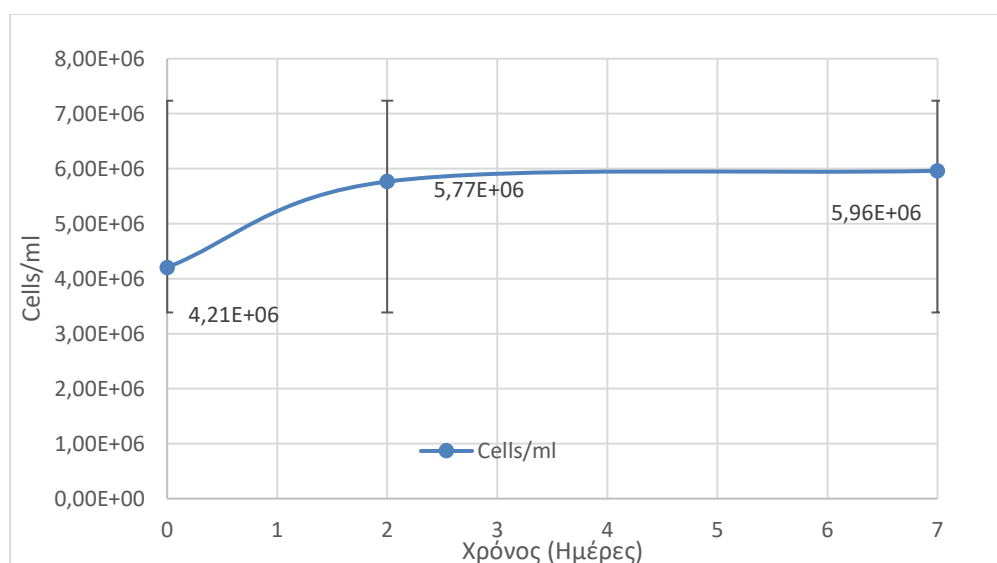
Στο παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε την αύξηση της τιμής του pH σε ένα 7ημερο κύκλο υπό την παρουσία του βακτηριακού στελέχους B1_4 με θρεπτικό μέσο που έχει ως πηγή άνθρακα την μαγιά. Παρατηρείται περίπου εκθετική αύξηση της τιμής του pH, με αρχική τιμή που ξεκινάει από 6.63 και φτάνει έως 8.16. Υπήρχαν κατά την διάρκεια του πειράματος ουδέτερες με αλκαλικές συνθήκες όπως προκύπτει από το διάγραμμα.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους B1_4, που απομονώθηκε από το δείγμα Β, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν το τυπικό σφάλμα.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει το συμπέρασμα ότι μετά το δεύτερο 24ωρο υπάρχει αύξηση του αριθμού των κυττάρων με το μέγιστο της ανάπτυξης να παρατηρείται την 4^η ημέρα του πειραματικού κύκλου. Το στέλεχος B1_4, αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο που είχε ως πηγή άνθρακα την μαγιά. Από την 4^η ημέρα και έπειτα παρατηρείται πτώση του αριθμού των κυττάρων η οποία σε συνδυασμό με το διάγραμμα 10, παρατηρείται και μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Με την σταδιακή μείωση του διαθέσιμου αντιμονίου, υπάρχει και μείωση του αριθμού των κυττάρων. Από έρευνα των Renjian Deng et al. (2021), βρέθηκε ότι το στέλεχος *Bosea* sp.AS-1, χρησιμοποιώντας μαγιά ως πηγή άνθρακα ήταν ικανό για οξειδωση του Sb (III), με την βοήθεια των γονιδίων aioA και aioB. Με βάση τα παραπάνω και σε συνδυασμό με το διάγραμμα 10, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος B1_4, είναι ικανό για μείωση της συνολικής συγκέντρωσης του αντιμονίου με την μέγιστη απομάκρυνση να είναι 36 % και να παρατηρείται την τελευταία μέρα του πειράματος όπου και ο αριθμός των κυττάρων παρουσιάζει μείωση. Η παραπάνω μείωση ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα του στελέχους B1_4, χρησιμοποιούν το διαθέσιμο αντιμόνιο για τις μεταβολικές και ενζυματικές διαδικασίες, ώστε να καταφέρουν να αποτοξικοποιηθούν από το αντιμόνιο.

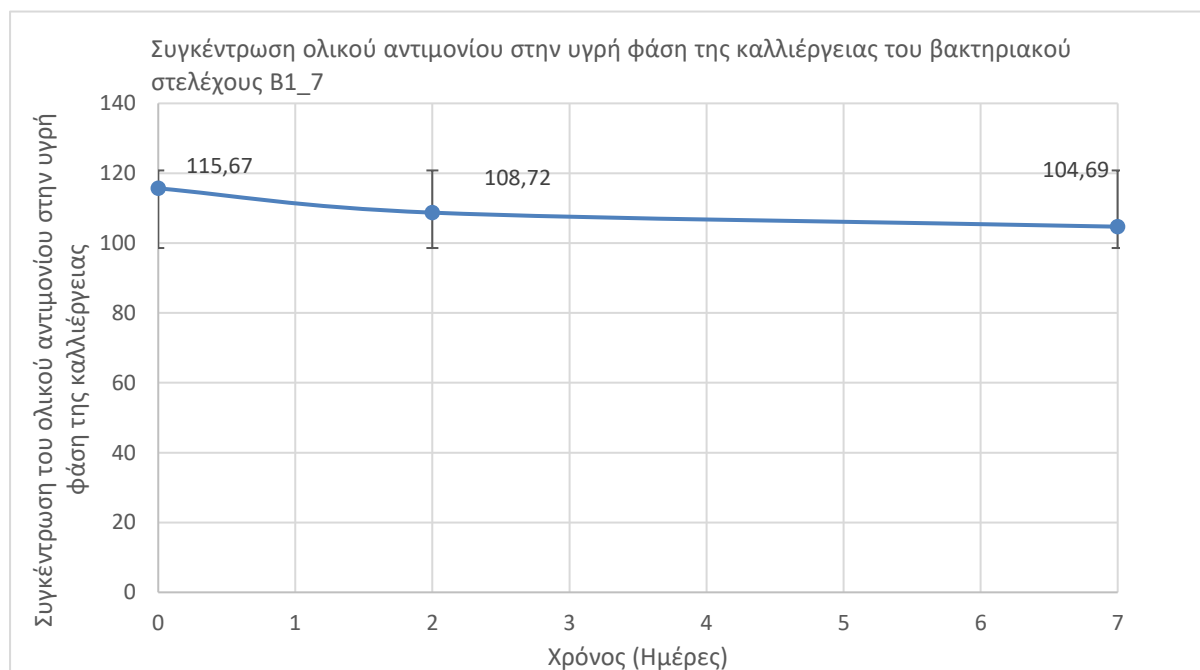
Αποτελέσματα από τους κύκλους που μελετήθηκαν με την προσθήκη θρεπτικού γλυκόζης D monohydrate -C₆H₁₄O₇



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους B1_7, που απομονώθηκε από το δείγμα B, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=2).

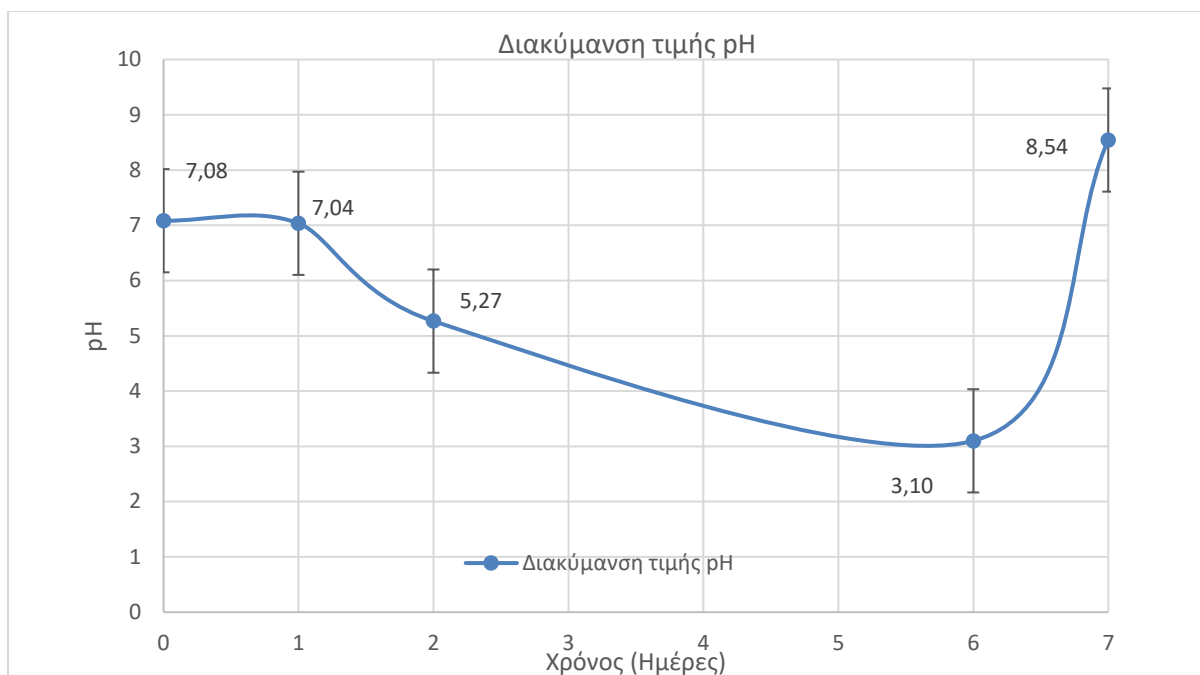
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται μικρή αύξηση του αριθμού των κυττάρων του στελέχους B1_7, κατά την διάρκεια ενός 7ημέρου πειραματικού κύκλου. Η χρήση της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα επέφερε μικρότερη ανάπτυξη στον αριθμό των κυττάρων του στελέχους B1_7, σε σχέση με τα στελέχη B1_4, B1_5, C1_6 που είχαν ως πηγή άνθρακα την μαγιά και το sodium lactate αντίστοιχα. Παράλληλα, με την παρατήρηση του διαγράμματος 14, προκύπτει το συμπέρασμα ότι με την αύξηση των κυττάρων την 2^η ημέρα, υπάρχει και μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Επιπλέον, την 7^η ημέρα του πειραματικού κύκλου που ο αριθμός των κυττάρων είναι στην μεγαλύτερη συγκέντρωση υπάρχει και απομάκρυνση του

ολικού αντιμονίου κατά 9.5 %. Με βάση όλα τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη των κυττάρων. Επιπλέον, το στέλεχος B1_7, είναι ικανό να αναπτύσσεται σε τοξικό περιβάλλον που επιφέρει η ύπαρξη το ιόν του τρισθενές αντιμονίου.



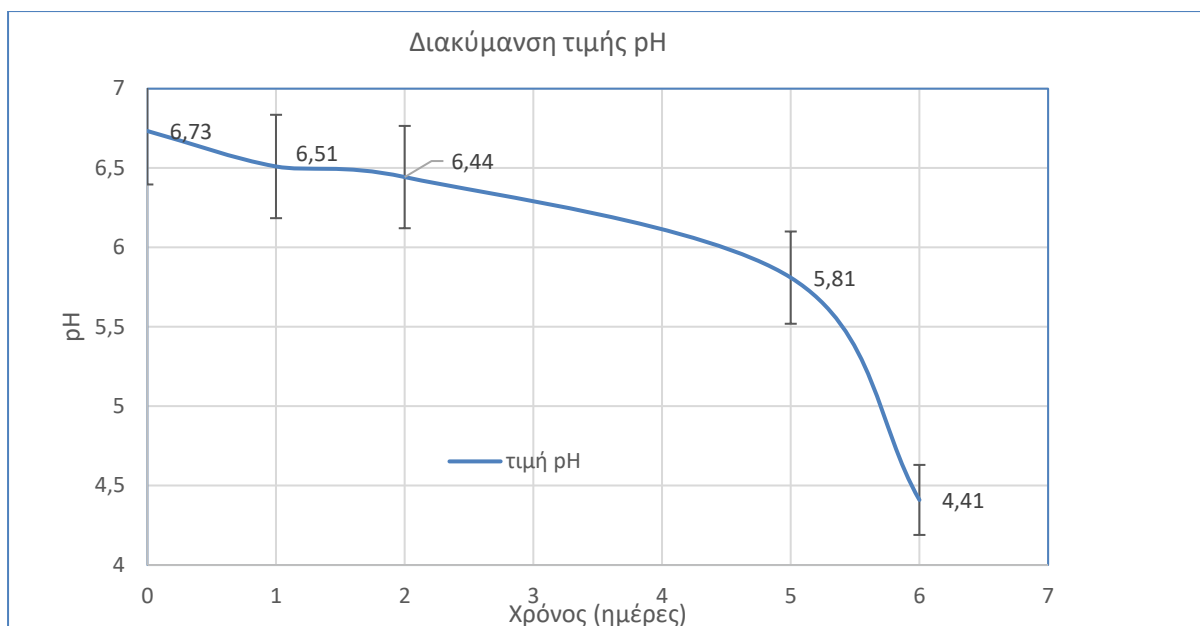
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14. Συγκέντρωση ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το βακτηριακό στέλεχος B1_7, συνάρτησι του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=2).

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου με την μέθοδο ICP-MS με την παρουσία στελέχους B1_7. Για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Παρατηρείται ότι η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή των στελεχών B1_4, C1_6, B1_5 στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα η μαγιά και το sodium lactate. Πιο συγκεκριμένα, η συνολική μείωση της συγκέντρωσης του αντιμονίου από το στέλεχος B1_7, ήταν της τάξεως 9.5 %, εν αντιθέσει με τα αναφερόμενα στελέχη, στα οποία η απομάκρυνση ήταν πάνω από 30%. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος B1_7, είναι ικανό να αναπτύσσεται σε θρεπτικό παρουσίας αντιμονίου αρχικής συγκέντρωσης 115 mg/L, με μικρή ικανότητα να μειώνει την συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου, η οποία ήταν της τάξεως του 9.5 %.



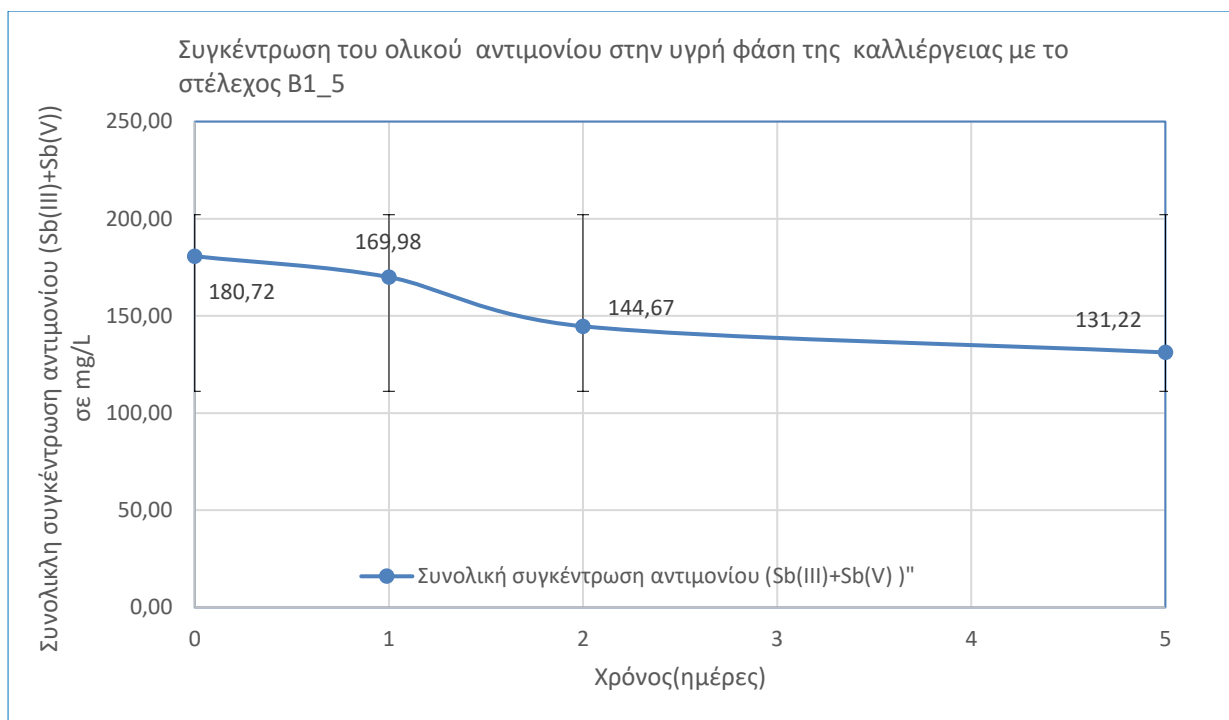
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 15. Διακύμανση της τιμής του pH, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν το τυπικό σφάλμα .

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται η διακύμανση της τιμής του pH κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας στο οποίο αναπτυσσόταν το στέλεχος B1_7. Το θρεπτικό στο οποίο έγινε η μέτρηση του pH, περιείχε ως πηγή άνθρακα την γλυκόζη. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα η αρχική τιμή του pH είναι 7.08 ενώ στην πορεία παρουσιάζει σταδιακή μείωση με την ελάχιστη τιμή να είναι την 6^η ημέρα που είναι 3.10. Επιπλέον, η τιμή του pH της τελευταίας ημέρας του πειράματος είναι η μεγαλύτερη, δηλαδή 8.54, καθώς έγινε προσθήκη σταγόνων NaOH στο θρεπτικό μέσο. Η προσθήκη σταγόνων NaOH πραγματοποιήθηκε καθώς για την ποιοτική μέτρηση της μείωσης του Sb(III) με το υπερμαγγανικό κάλιο χρειαζόταν να υπήρχαν ουδέτερες με αλκαλικές συνθήκες. Με βάση όλα τα παραπάνω οι συνθήκες που επικρατούσαν κατά την διάρκεια του συγκεκριμένου πειραματικού κύκλου με το στέλεχος B1_7, ήταν αρχικά ουδέτερες και στην συνέχεια όξινης.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 16. Η διακύμανση της τιμής του pH κατά την διάρκεια ενός δήμερου πειραματικού κύκλου με το στέλεχος B1_5. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση ($n=3$).

Όπως διακρίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα η μέτρηση της τιμής του pH στο θρεπτικό που περιείχε γλυκόζη παρουσίασε μείωση. Πιο συγκεκριμένα η αρχική τιμή του pH ήταν 6.73 και η πτώση ήταν καθημερινή με την τελική τιμή του pH να είναι 4.41. Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι οι συνθήκες που επικρατούσαν στην πειραματική μελέτη του στελέχους B1_5, ήταν όξινες.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 17. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος B1_5.

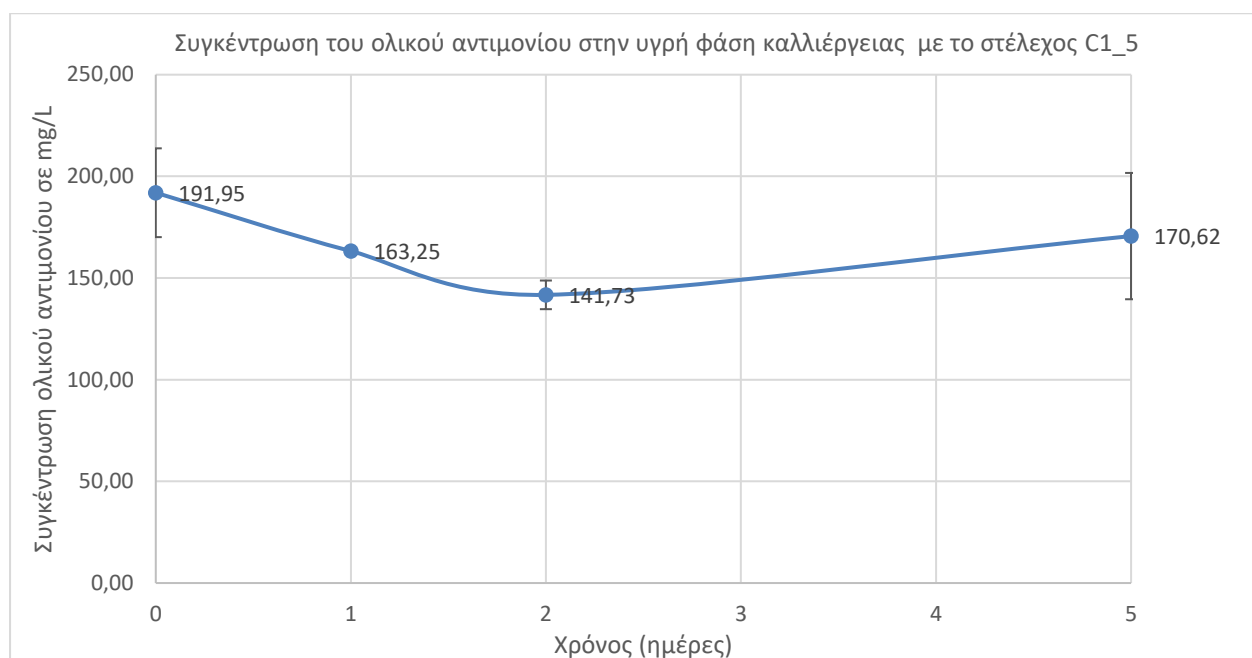
Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=2).

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου με την μέθοδο ICP-MS. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι μετά την 2 ημέρα και έπειτα υπάρχει μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου η οποία φτάνει έως και 27 % της αρχικής συγκέντρωσης. Το ίδιο στέλεχος B1_5, παρουσίασε διαφορετική ικανότητα μείωσης της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου όταν στο θρεπτικό προστέθηκε γλυκόζη αντί για γαλακτικό νάτριο. Πιο συγκεκριμένα, με την χρήση γαλακτικού νατρίου ως πηγή άνθρακα είχε μείωση 68 %, η οποία είναι 2.5 φορές μεγαλύτερη από την μείωση με χρήση πηγής άνθρακα την γλυκόζη. Με βάση τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος B1_5 μπορεί να αναπτύσσεται σε θρεπτικό παρουσίας αντιμονίου, αλλά είναι ικανό να μειώσει και την συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου.

Ανάπτυξη στελεχούς B1_5, σε θρεπτικό με γλυκόζη

Η καμπύλη της ανάπτυξης του αριθμού των κυττάρων του στελεχούς B1_5, παρουσίασε μείωση από την ημέρα έναρξης στην ημέρα λήξης του πειράματος. Το ίδιο στέλεχος το οποίο αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο που είχε ως πηγή άνθρακα το sodium lactate αντι της γλυκόζης παρουσίασε αύξηση στον αριθμό των κυττάρων κατά την διάρκεια του πειράματος. Πιο αναλυτικά, στην ανάπτυξη του στελεχούς B1_5, με γλυκόζη ο αριθμός των κυττάρων την ημέρα έναρξης, ήταν της τάξης του 2.06×10^7 , ενώ με την το sodium lactate ήταν 4.56×10^6 , όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 9. Αντιθέτως, την ημέρα λήξης του πειράματος ο αριθμός των κυττάρων του στελεχούς B1_5, σε θρεπτικό με γλυκόζη ήταν 2.28×10^6 , 88.94% λιγότερο από τον αρχικό αριθμό των κυττάρων. Εν αντιθέσει, το ίδιο στέλεχος με ανάπτυξη σε θρεπτικό sodium lactate την τελευταία ημέρα ο αριθμός των κυττάρων ήταν 5.76×10^8 . Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε αφενός ότι το sodium lactate, ήταν ιδανικότερο για την ανάπτυξη των βακτηρίων καθώς ο αριθμός των κυττάρων τους αυξήθηκε κατά 2 μονάδες

από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος, και αφετέρου ότι η μείωση του αριθμού των κυττάρων να οφείλεται σε μηχανισμό αποτοξικοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση του αριθμού των κυττάρων από το στέλεχος B1_5 ίσως να οφείλεται στην μεθυλίωση του ανόργανου Sb(III) σε τριμεθυλοαντιμόνιο ως αποτέλεσμα κυτταρικής αποτοξίνωσης. Έρευνες των Zang et al.(2021), είχαν δείξει ότι η μεθυλίωση μπορεί να γίνει είτε από βακτήρια είτε από μύκητες. Επιπλέον, οι Jenkins et al.(1998), ανακάλυψαν νηματώδεις μύκητες τους *Scopulariopsis brevicaulis* και *Phaeolus schweinitzii* που μπορούσαν να μετατρέψουν το ανόργανο τρυγικό κάλιο αντιμονίου σε τριμεθυλοαντιμόνιο υπό αερόβιες συνθήκες.



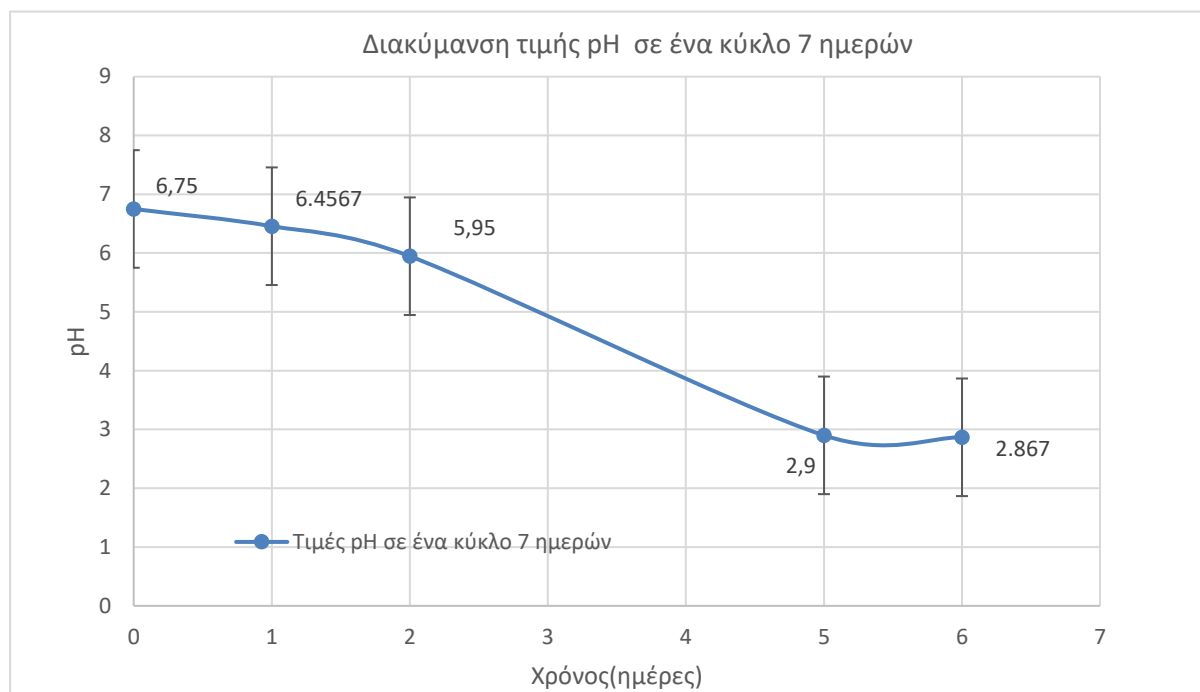
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 18. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος C1_5, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=3).

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου με την μέθοδο ICP-MS. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι μετά την 1 ημέρα και έπειτα υπάρχει μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου η οποία φτάνει έως και 11 % της αρχικής συγκέντρωσης. Παρατηρείται ότι στέλεχος C1_5 παρουσιάζει μικρότερη μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου σε σχέση με το στέλεχος B1_5- μείωση 27 %- με την ίδια πηγή άνθρακα (γλυκόζη). Με βάση τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος C1_5 μπορεί να αναπτύσσεται σε θρεπτικό παρουσίας αντιμονίου, αλλά είναι ικανό να μειώσει και την συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου σε ποσοστό της τάξεως 11 %. Επιπλέον, η τελευταία τιμή 170.62 mg/L πιθανώς να οφείλεται σε λάθος κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας ή το δείγμα συλλέχθηκε χωρίς να γίνει καλή ανάδευση.

Ανάπτυξη στελεχούς C1_5, σε θρεπτικό με γλυκόζη

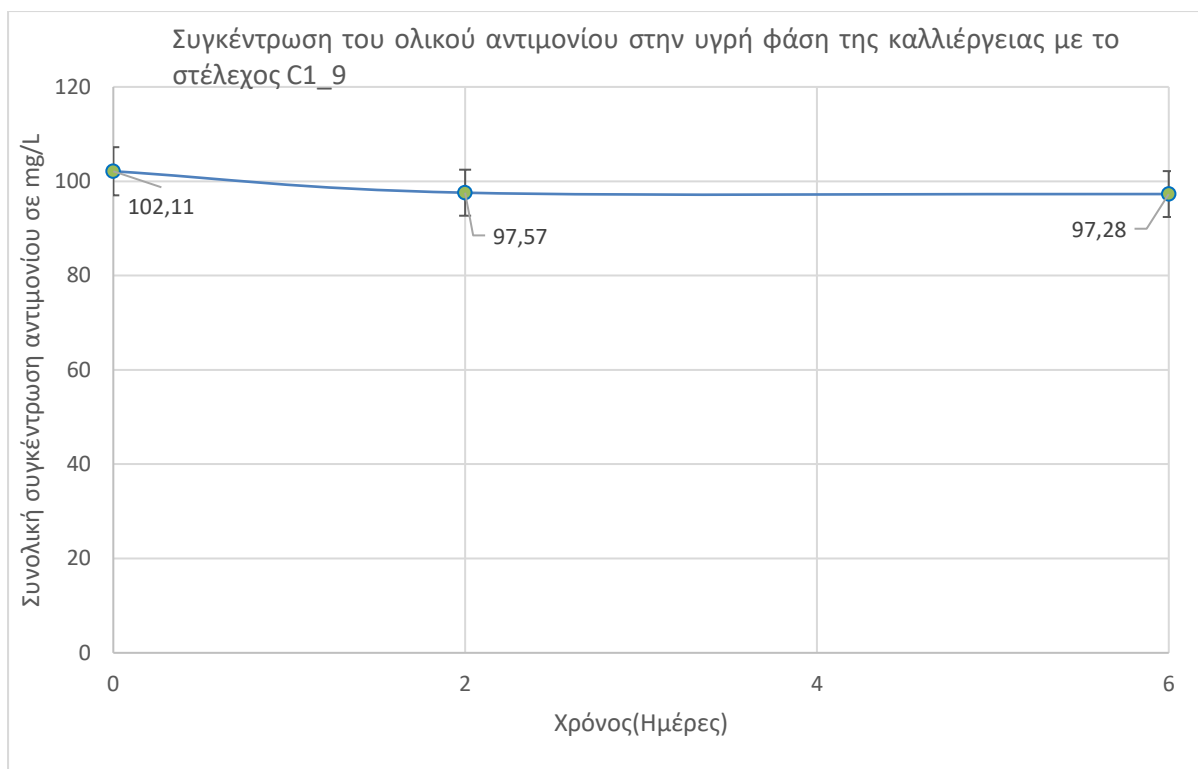
Η ανάπτυξη του στελεχούς C1_5, σε θρεπτικό με πηγή άνθρακα την γλυκόζη, ήταν περιορισμένη. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ημέρα έναρξης του πειραματικού κύκλου ο αριθμός των κυττάρων ήταν 7.17×10^6 , ενώ την τελευταία ημέρα ήταν 8.14×10^6 . Επιπλέον, σε συνδυασμό με το διάγραμμα 19 της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου, η ανάπτυξη του C1_5, συνδέεται άμεσα με την ύπαρξη του ολικού αντιμονίου. Αυτό οφείλεται στο ότι το στέλεχος C1_5, για να αναπτυχθεί στην τοξικότητα του αντιμονίου είτε προσροφά είτε

μεθυλιώνει ένα μέρος της συγκέντρωσης του αντιμονίου. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος C1_5 είναι ικανό να αναπτύσσεται στην τοξικότητα του αντιμονίου αλλά ταυτόχρονα να απομακρύνει ένα ποσοστό της τάξης του 11 % κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 19. Η διακύμανση της τιμής του pH σε έναν δήμερο πειραματικό κύκλο με το στέλεχος C1_5. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση ($n=3$).

Από το παραπάνω διάγραμμα, γίνεται εμφανές ότι η τιμή του pH παρουσιάζει μείωση στην διάρκεια ενός δήμερου κύκλου. Πιο συγκεκριμένα η αρχική τιμή του pH είναι 6.75 και φτάνει έως 2.87. Με βάση τα παραπάνω, οι συνθήκες που επικρατούσαν κατά την διεξαγωγή του πειραματικού κύκλου με το στέλεχος C1_5, ήταν αρχικά ουδέτερες και στην συνέχεια όξινης.

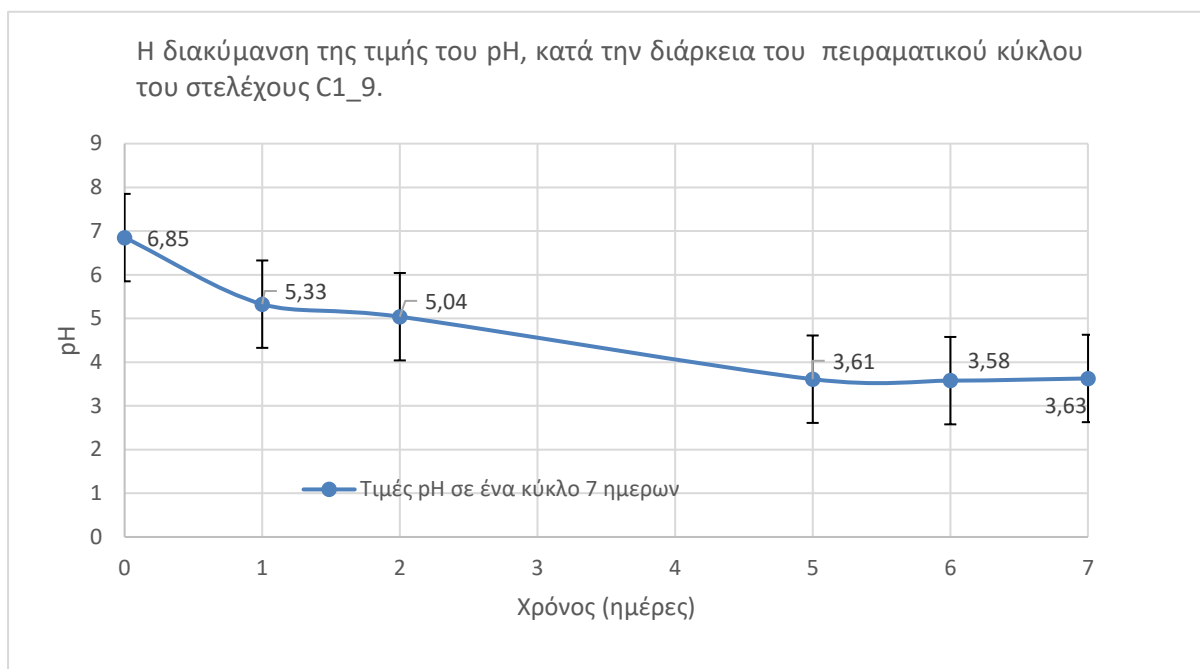


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 20. Η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος C1_9. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=2).

Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει την συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου παρουσίας του στελέχους C1_9, κατά την διάρκεια του 6ήμερου πειραματικού κύκλου. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα η αρχική συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου ήταν 102 mg/L. Στην συνέχεια του κύκλου παρουσιάζεται μια μείωση, η οποία την τελική ημέρα του πειράματος ήταν της τάξεως 4.7 % σε σχέση με την αρχική. Με βάση τα παραπάνω, το στέλεχος C1_9, είναι ικανό να απομακρύνει το ολικό αντιμόνιο σε ένα επίπεδο το οποίο είναι κάτω του 10% της αρχικής συγκέντρωσης.

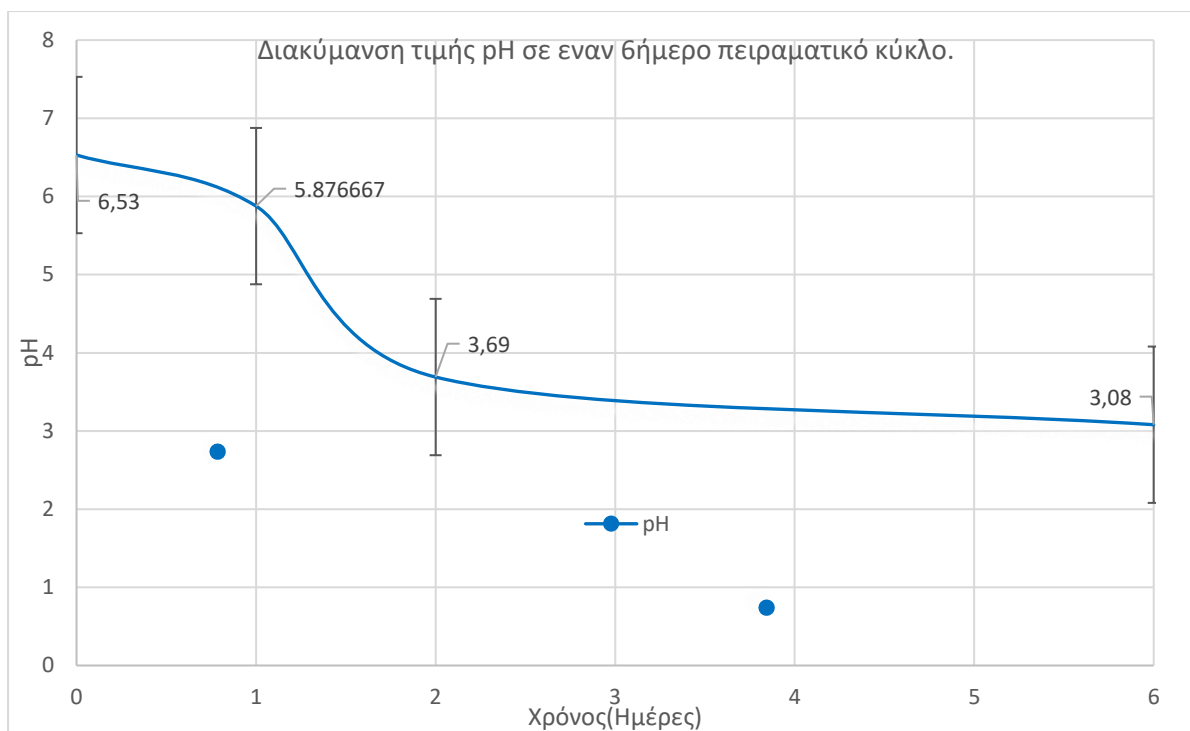
Ανάπτυξη στελέχους C1_9, σε θρεπτικό με γλυκόζη

Ο αριθμός των κυττάρων, του στελέχους C1_9, την ημέρα έναρξης του πειράματος ήταν 2.70×10^6 . Το στέλεχος C1_9, παρουσίασε γρήγορη προσαρμογή στο καινούριο περιβάλλον, με πιθανή παραγωγή των απαραίτητων ενζύμων ικανών να μεταβολίσουν την γλυκόζη, για την έναρξη του καταβολισμού. Στην συνέχεια, μέσα στο πρώτο 24ώρο του κύκλου, το στέλεχος παρουσίασε την φάση επιτάχυνσης κατά την οποία υπήρχε αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Μετά την 1ημέρα του κύκλου και έπειτα υπήρχε εκθετική ανάπτυξη με την μέτρηση του αριθμού των κυττάρων να είναι 9.49×10^7 , και σύμφωνα με το διάγραμμα 22 σε αυτό το διάστημα το στέλεχος μειώνει και την συγκέντρωση του αντιμονίου. Τέλος, ο αριθμός των κυττάρων, την τελευταία ημέρα της πειραματικής διαδικασίας ήταν 1.08×10^7 , γεγονός που υποδηλώνει την φάση θανάτου. Επιπλέον, σύμφωνα και με το διάγραμμα 22, στο μέγιστο του αριθμού των κυττάρων του στελέχους C1_9(9.49×10^7), η συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου παρουσιάζει πτώση της τάξης του 4.5 %. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος C1_9, είναι αφενός ικανό να αναπτύσσεται σε τοξικό περιβάλλον που προκαλεί το ιόν τρισθενές αντιμόνιο και αφετέρου να απομακρύνει σε μικρό ποσοστό το ολικό αντιμόνιο.



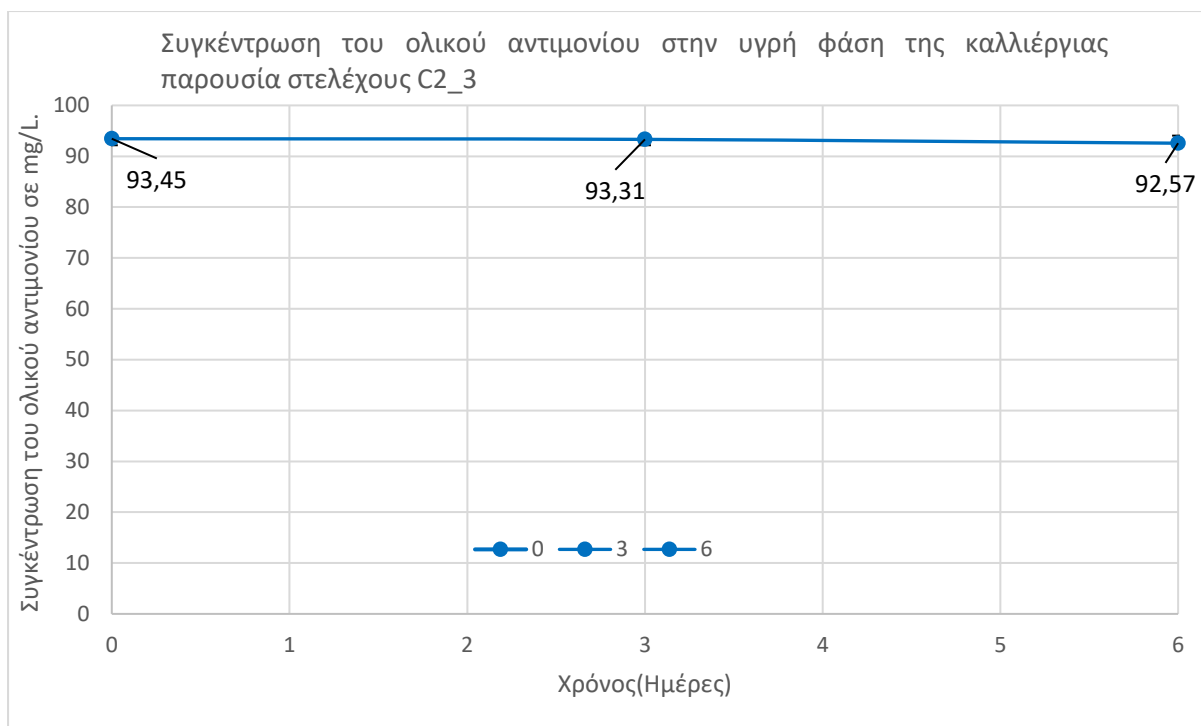
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 21. Η διακύμανση της τιμής του pH, σε έναν 7ήμερο πειραματικό κύκλο με το στέλεχος C1_9. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση ($n=3$).

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι η τιμή του pH παρουσιάζει μείωση κατά την διάρκεια του 7ήμερου κύκλου. Πιο συγκεκριμένα η αρχική τιμή ήταν 6.85 ενώ με το πέρας των ημερών υπάρχει καθημερινή μείωση έως την τελική τιμή που φτάνει 3.63. Προκύπτει το συμπέρασμα, ότι κατά την διεξαγωγή του πειράματος με εξαίρεση την πρώτη ημέρα οι συνθήκες που επικρατούσαν ήταν όξινες.



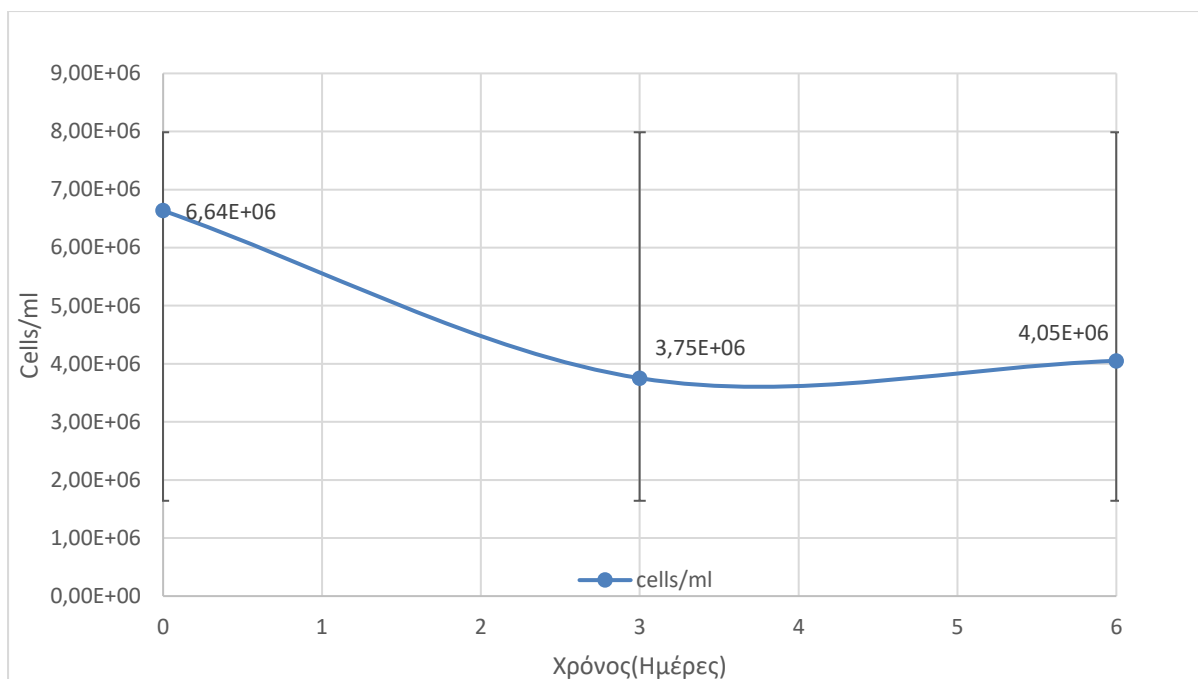
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 22. Διακύμανση τιμής pH, όπως παρατηρήθηκε σε έναν 6ήμερο πειραματικό κύκλο. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση ($n=3$).

Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει την διακύμανση της τιμής του pH, όπως μετρήθηκε στην υγρή καλλιέργεια του στελέχους C2_3, σε ένα πειραματικό κύκλο 6 ημερών. Όπως προκύπτει από το διάγραμμα οι αρχικές συνθήκες του πειράματος ήταν ουδέτερες και στην συνέχεια υπήρχε σταδιακή μείωση της τιμής του pH, ώστε οι επικρατούσες συνθήκες στο τέλος να είναι όξινες.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 23. Συγκέντρωση ολικού αντιμονίου στην υγρή φάση της καλλιέργειας με το στέλεχος C2_3, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση ($n = 2$).

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου κατά την διάρκεια ενός κύκλου 6 ημέρων, παρουσία του στελέχους C2_3. Όπως διακρίνεται η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου από το στέλεχος C2_3 είναι κάτω της μονάδας και πιο συγκεκριμένα 0.9 %. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος C2_3, δεν είναι ικανό να μειώνει την συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 24. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους C2_3, συναρτήσει του χρόνου. Οι γραμμές σφαλμάτων δείχνουν την τυπική απόκλιση (n=2).

Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει την καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους C2_3, κατά την διάρκεια του 6ήμερου πειραματικού κύκλου. Όπως διακρίνεται η ανάπτυξη του στελέχους έχει σταδιακή μείωση κατά την διάρκεια του πειραματικού κύκλου. Επιπλέον, την 6ημέρα του πειράματος παρουσιάζεται μια αύξηση του αριθμού των κυττάρων η οποία πιθανών να είναι από την παρουσία και των μη ζωντανών κυττάρων, καθώς το κυτταρόμετρο μετρά την οπτική ικανότητα όλων των κυττάρων. Με βάση τα παραπάνω και σε συνδυασμό με το διάγραμμα 26, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος C2_3, δεν είναι ικανό να μειώνει την συγκέντρωση του ολικού αντιμονίου. Η τοξικότητα που επιφέρει το ιόν τρισθενές αντιμονίου επηρεάζει το στέλεχος C2_3, στην ανάπτυξη του.

6.7. Συζήτηση

Για την μελέτη των πειραματικών κύκλων χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές πηγές άνθρακα sodium lactate, μαγιά και γλυκόζη. Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα, ένα από τα κυριότερα συμπεράσματα που προέκυψαν είναι ότι οι διαφορετικές πηγές άνθρακα επέφεραν και διαφορετικά αποτελέσματα στην τιμή του pH. Πιο συγκεκριμένα, με την προσθήκη θρεπτικού που περιείχε sodium lactate ως πηγή άνθρακα το pH έδειχνε ανοδική πορεία για όλους τους κύκλους που μελετήθηκαν με την παρουσία στελεχών B1_5, C1_6 και της κοινότητας B2. Η προσθήκη μαγιάς είχε παρόμοια αποτελέσματα στην διακύμανση της τιμής του pH με το sodium lactate, αλλά παρουσίασε πιο εκθετική αύξηση. Ενδεικτικά με το sodium lactate ή την μαγιά το εύρος της τιμής pH ήταν από 6.30 έως 8.30 με μερικές εξαιρέσεις για το sodium lactate που είχε ως αρχική τιμή 5.61 (sodium lactate)και τελική τιμή 8.77. Ωστόσο, με την αλλαγή της πηγής άνθρακα σε γλυκόζη, σε όλους τους κύκλους που μελετήθηκαν η διακύμανση του pH παρουσίασε πτώση. Πιο συγκεκριμένα, με την ανάπτυξη θρεπτικού με γλυκόζη το εύρος της τιμής του pH ήταν από 6.70 έως 4.90 με την χαμηλότερη τελική τιμή που παρουσιάστηκε να είναι 2.97. Επειδή η ποιοτική μέτρηση του αντιμονίου με το KMnO_4 απαιτούσε την ρύθμιση του pH να είναι στο ± 7 , ρυθμιζόταν με σταγόνες NaOH . Ωστόσο, ακόμα και με την καθημερινή ρύθμιση της τιμής του pH σε ± 7 στο θρεπτικό που περιείχε γλυκόζη, η μείωση της τιμής του pH συνέχισε να παρατηρείται κατά την διάρκεια του πειραματικού κύκλου. Μία πιθανή εξήγηση της μείωσης του pH να οφείλεται στο ότι η κλίμακα του pH μετράει τον αριθμό κατιόντων υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, όσο πιο μικρό είναι το pH, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του σε κατιόντα υδρογόνου. Επιπλέον, η γλυκόζη είναι δότης 6 ατόμων υδρογόνου σε αντίθεση με το sodium lactate που είναι δότης ενός ατόμου. Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι όταν η πολύ διαλυτή ένωση D-γλυκόζη διαλυθεί στο νερό, τα κατιόντα υδρογόνου είναι περισσότερα και άρα κάνει το pH πιο όξινο σε σχέση με το sodium lactate. Με αυτόν τρόπο, ίσως οι δύο διαλυτές ουσίες (αντιμόνιο και γλυκόζη) να διεκδικούν μια θέση υποστρώματος στο ένζυμο. Η μείωση του pH, να οδήγησε στην ενίσχυση της θέσης του αντιμονίου. Στην εικόνα 26 που παρατίθεται παρακάτω, παρουσιάζονται οι τιμές της κλίμακας pH, που ενισχύουν την ενζυματική δραστηριότητα. Με βάση τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα με την παρουσία διαφορετικών πηγών άνθρακα προκύπτει και διαφορετικό αποτέλεσμα στην τιμή του pH.

Το sodium lactate, η μαγιά και η γλυκόζη αποτέλεσαν τις πηγές άνθρακα που είναι απαραίτητες για τους μικροοργανισμούς ώστε να οξειδώσουν το τρισθενές αντιμόνιο. Πιο συγκεκριμένα η ζωή που ξέρουμε σε όλες τις μορφές της, βασίζεται σε συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Με αυτό τον τρόπο τα βακτήρια χρησιμοποιούν τις οργανικές ενώσεις που υπήρχαν στο θρεπτικό όπως είναι η γλυκόζη και το sodium lactate για να επιτύχουν την οξειδοαναγωγή του αντιμονίου. Οι εργαστηριακές συνθήκες που υπήρχαν κατά την πειραματική διαδικασία ήταν αερόβιες. Επιπλέον, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό αλκαλικές, ουδέτερες καθώς και όξινες συνθήκες.

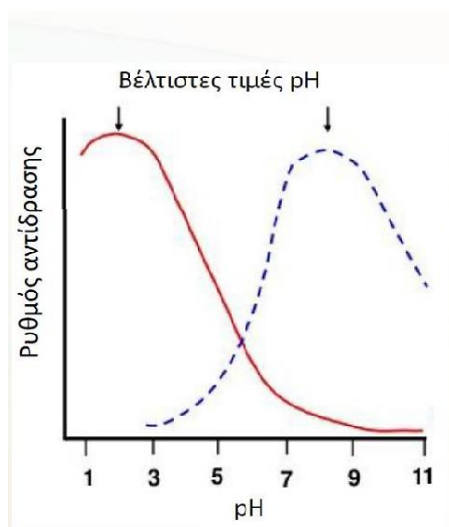
Ένα άλλο κύριο συμπέρασμα που προέκυψε ότι αναλόγως την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε τα βακτηριακά στελέχη παρουσίασαν διαφορετική ικανότητα μείωσης της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Πιο συγκεκριμένα με την χρήση του sodium lactate η κοινότητα B2 παρουσίασε την μεγαλύτερη ικανότητα μείωσης του ολικού αντιμονίου η οποία ήταν της τάξεως 78 %. Τα στελέχη C1_6 και B1_5 παρουσίασαν μείωση της τάξης 69 % και 68 % αντίστοιχα. Με την χρήση μαγιάς το στέλεχος B1_4, παρουσίασε μείωση της τάξης 36 %. Ωστόσο, με την χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα το στέλεχος B1_5 έδειξε μείωση της

συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου 27%, 2.5 φορές μικρότερη σε σχέση με όταν χρησιμοποιήθηκε sodium lactate. Επιπλέον, τα υπόλοιπα στελέχη στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα η γλυκόζη, όπως είναι το B1_7, C1_5, C1_9 παρουσίασαν μείωση της συγκέντρωσης της τάξης 9.5 %, 11 % και 4.7 % αντίστοιχα. Παράλληλα, το στέλεχος C2_3, παρουσίασε την μικρότερη μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα, την γλυκόζη, η οποία ήταν σχεδόν μηδαμινή, δηλαδή, 0.9 %. Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι ανάλογα την πηγή άνθρακα που προστίθεται στο θρεπτικό τα βακτήρια παρουσιάζουν και διαφορετική ικανότητα μείωσης της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου. Από έρευνα των Renjian Deng et al. (2021), αναφέρουν ότι η πηγή άνθρακα θα επηρεάσει τον ρυθμό οξείδωσης από τα βακτήρια που οξειδώνουν το Sb (III). Τα ετερότροφα, χημικοσυνθετικά βακτήρια μέσω της διαδικασίας της αερόβιας αναπνοής χρησιμοποιούσαν το sodium lactate, την μαγιά ή την γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

Ένα άλλο συμπέρασμα που προέκυψε από την παρούσα διπλωματική είναι ότι τα στελέχη B1_5, C1_6 καθώς και η κοινότητα B2 παρουσίασαν μεγάλη ικανότητα μείωσης της συνολικής συγκέντρωσης του αντιμονίου (τρισθενές και πεντασθενές). Αυτή η μείωση έφτασε σε ένα ποσοστό της τάξης του 80 %. Με την χρήση του υπερμαγγανικού καλίου, ήταν δυνατόν να παρατηρήσουμε ότι η μείωση της συνολικής συγκέντρωσης του αντιμονίου προήλθε από την μετατροπή του ανόργανου Sb (III) σε Sb(V). Υποθέτουμε ότι τα στελέχη B1_5, C1_6 καθώς και η κοινότητα B2, μετέτρεψαν το Sb(III) σε Sb (V), ώστε να μειώσουν την τοξικότητα από το Sb (III). Δεδομένου ότι τα παραπάνω στελέχη αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό που περιείχε ως πηγή άνθρακα το sodium lactate, η οξείδωση μπορεί να ήταν επιτυχής ως αποτέλεσμα μικροβιακής ρόφησης. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3, το στέλεχος *Acinetobacter* sp.JH7 με τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα (Jihai Ju et al., 2019). Οι Jihai et al.(2019), επιπλέον, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μείωση της τοξικότητας του αντιμονίου από το *Acinetobacter* sp.JH7, να σχετίζεται με την ικανότητα βιορόφησης του Sb (III).

Από την άλλη πλευρά, η ικανότητα μείωσης της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου όπως και της οξείδωσης του Sb(III), μειώθηκε όταν αντικαταστάθηκε το sodium lactate με την μαγιά. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε μόνο μία μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού αντιμονίου όταν χρησιμοποιήθηκε μαγιά με αποτέλεσμα να μην υπάρχει μια ξεκάθαρη εικόνα. Με βάση τον πίνακα 3, το στέλεχος *Bosea* sp.AS-1 παρουσίασε αλλαγή στον ρυθμό και την ικανότητα οξείδωσης του Sb (III), όταν αντικαταστάθηκε το sodium lactate με την μαγιά (Xiaolu Lu et al., 2018). Από την ποιοτική μέτρηση που πραγματοποιήθηκε με το KMnO₄, προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα στελέχη B1_5, C1_6 καθώς και η κοινότητα B2 παρουσίασαν ικανότητα οξείδωσης του Sb(III). Αυτό όπως αναφέρθηκε παραπάνω μπορεί να είναι αποτέλεσμα μηχανισμού των χημειοετερότροφων αερόβιων βακτηρίων να αντιστέκονται στην τοξικότητα που επιφέρει το Sb(III). Από όλα τα παραπάνω που αναλύθηκαν και των πειραμάτων που έγιναν, προκύπτει ότι συνολικά 19 βακτηριακά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από το έδαφος βρέθηκαν ικανά να αναπτύσσονται υπό την παρουσία 240 mg/L συγκέντρωσης Sb(III). Ανάμεσα σε αυτά η κοινότητα B2 και τα στελέχη C1_6, B1_5 βρέθηκαν ικανά να οξειδώνουν το Sb (III) σε Sb(V) με την καταλληλότερη πηγή άνθρακα να είναι το sodium lactate και τις αλκαλικές συνθήκες πιο ιδανικές για την οξείδωση όπως συμπεραίνουμε και από το βιβλιογραφικό πίνακα 3 που παρατίθεται παρακάτω. Μελλοντικές μελέτες για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών και των βιοχημικών μονοπατιών με τα οποία τα βακτήρια οξειδώνουν το Sb(III)σε Sb(V), κρίνονται απαραίτητες. Επιπλέον , παρατίθεται και ο πίνακας 8 στον οποίο περιέχονται τα μέχρι τώρα γονίδια που έχουν ανακαλυφθεί να εμπλέκονται στον

μεταβολισμό του αντιμονίου, πιθανών και των μελετώμενων στελεχών της παρούσας διπλωματικής.



ΕΙΚΟΝΑ 26. Οι βέλτιστες τιμές pH, στις οποίες ενεργοποιούνται τα ένζυμα σε μια αντίδραση. (Δανάη Βενιέρη - Ανέστης Βλυσίδης, Μικροβιολογία, 2022).

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Εμπλεκόμενα γονίδια στον μεταβολισμό του αντιμονίου (Christon J Hurst, 2022).

Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Λειτουργία	Στέλεχος	Πηγές
Οξείδωση Sb (III)				
aioA και aioB	Οξειδάση As(III)	Εμπλέκεται στην οξείδωση του Sb (III), As(III)	<i>Roseomonas rhizosphaerae</i> YW11	Sun et al., (2020)
mcp	Γονίδιο που κωδικοποιεί χημειουποδοχέα	Εμπλέκεται στην έκφραση του aioAB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GW4	Shi et al., (2017)
aioR	Ρυθμιστής μεταγραφής	Ρυθμίζει την έκφραση του aioAB και mcp	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GW4	Shi et al., (2017)
anoA	Οξειδοαναγωγή	Οξειδώνει το Sb (III)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GW4	Li et al., (2015)
arsV	Φλαβινοεξαρτώμενη μονοοξυγενάση	Οξειδώνει το Sb (II) και το TMAs(III)	<i>Ensifer adhaerens</i> ST2	Zhang et al., (2021)
gshA	Γλουταμινική κυστεΐνη λιγάση	Έμμεση αναστολή της οξείδωσης του Sb(III) με αποικοδόμηση του H ₂ O ₂	<i>Pseudomonas stutzeri</i> TS44	Wang et al., (2016)

katA	Καταλάση-περοοξειδάση	Έμμεση αναστολή της οξειδωσης του Sb(III) με αποικοδόμηση του H ₂ O ₂	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GW4	Li et al., (2017)
phoA, και phoB	Πρωτεΐνη αισθητήρα φωσφορικού ρυθμιστή	Ρυθμίζει την έκφραση του aioAB	<i>Halomonas</i> sp. HAL1	Chen et al., (2015)

Αναγωγή του Sb(V)

ACR1	Μεταγραφική ρυθμιστική πρωτεΐνη	Ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου ACR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bobrowicz et al., (1997)
ACR2	As(V) αναγωγάση	Μειώνει το Sb (V) και το As(V)	<i>Leishmania major</i>	Zhou et al., (2004)
arrA και arrB	Αναπνευστικές αναγωγάσες	Μειώνει το Sb(V) και As (V)	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	Wang et al., (2020)
luxS	S-ριβοσυλομοκυστεΐνη λυάση	Ρυθμίζει την έκφραση του arrAB	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	Wang et al., (2020)
TDR1	Θείο-εξαρωτάμενη αναγωγάση(-SH)	Μειώνει το Sb(V)	<i>Leishmania major</i>	Denton et al., (2004)

Sb μεταφορά

ACR3	As (III) αντλία εκροής	Μεσολαβεί στην εκροή του As(III) και Sb(III)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Maciaszczyk-Dziubinska et al. (2010)
antA	Ειδική ATPάση για την εκροή του αντιμονίτη	Εμπλέκεται στην εκροή του Sb(III)	<i>Comamonas testosteroni</i> JL40	An et al., (2021)
Aqp1	Ακουαπορίνη-1	Η Πρόσληψη του Sb(III), As(III) από ένα συγκεκριμένο κανάλι νερού	<i>Leishmania promastigotes</i>	Gourbal et al., (2004)
Aqp7	Ακουαπορίνη-7	Η πρόσληψη του As(III), Sb(III) , γίνεται από την μεσολάβηση του καναλιού νερού, γλυκερόλης και ουρίας	<i>Xenopus oocytes</i>	Li et al., (2002)
Aqp9	Ακουαπορίνη-9	Η πρόσληψη Sb(III) και As(III) σχηματίζουν κανάλι νερού με ευρεία εξειδίκευση	<i>Saccharomyces cerevisiae, Xenopus oocytes</i>	Li et al., (2002)
arsA	Αντλία Αρσενικού που μεταφέρει ATPάση	Καταλυτική υπομονάδα μιας ATPάσης που μεταφέρει ανιόντα	<i>Escherichia coli</i>	Bhattacharjee et al. (1995)
arsB	Πρωτεΐνη μεμβράνης αντλίας	Σχηματίζει το κανάλι για την εξώθηση του	<i>Comamonas</i> sp. S44	Li et al., (2013)

	αρσενικού	As(III) και Sb(III)		
arsD	As Μεταλλοχαπερόνη	Αυξάνει την μεταγραφή του ars σε υψηλά επίπεδα	<i>Escherichia coli</i>	Chen and Rosen (1997)
arsK	Μεταφορέας εκροής As(III)	Εμπλέκεται στην εκροή του As(III) και Sb(III)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GW4	Shi et al., (2018)
arsR	Καταστολέας οπερονίου για την σύνθεση του As	Αυξάνει την μεταγραφή ars σε χαμηλό επίπεδο επαγωγέα	<i>Escherichia coli</i>	Chen and Rosen (1997)
arsR2	Ρυθμιστής μεταγραφής οικογένειας arsR	Ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου arsK	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GW4	Shi et al., (2018)
FPS1	Πρωτεΐνη διευκόλυνσης πρόσληψης/ εκροής γλυκερόλης	Πρόσληψη του As(III), Sb(III), στα κύτταρα της μαγιάς από το κανάλι της γλυκερόλης	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wysocki et al., (2001)
glpF	Πρωτεΐνη διευκόλυνσης της πρόσληψης γλυκερόλης	Πρόσληψη του As(III), Sb(III), μεταφορέας της γλυκερόλης μέσα στην κυτταροπλασματική ή μεμβράνη	<i>Escherichia coli</i>	Meng et al., (2004)
mrpA	Μεταφορέας ABC	Εμπλέκεται στην εκροή του Sb(III)	<i>Leishmania infantum</i>	Douanne et al., (2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Βιβλιογραφία

- An, Youn-Joo, and Minjin Kim. "Effect of antimony on the microbial growth and the activities of soil enzymes." *Chemosphere* 74.5 (2009): 654-659.
- Anderson, Corby G. "The metallurgy of antimony." *Geochemistry* 72 (2012): 3-8.
- Belzile, Nelson, Yu-Wei Chen, and Zijian Wang. "Oxidation of antimony (III) by amorphous iron and manganese oxyhydroxides." *Chemical Geology* 174.4 (2001): 379-387.
- Bolan, Nanthi, et al. "Antimony contamination and its risk management in complex environmental settings: A review." *Environment International* 158 (2022): 106908.
- Cai, Jie, Kirsty Salmon, and Michael S. DuBow. "A chromosomal ars operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*." *Microbiology* 144.10 (1998): 2705-2729.
- Cao, Yaowu, et al. "Sb (III) and Sb (V) removal from water by a hydroxyl-intercalated, mechanochemically synthesized Mg-Fe-LDH." *Applied Clay Science* 196 (2020): 105766.
- Choi, Wonyoung, et al. "Characterization of diversified Sb (V)-reducing bacterial communities by various organic or inorganic electron donors." *Bioresource technology* 250 (2018): 239-246.
- Choi, Wonyoung, Jaecheul Yu, and Taeho Lee. "Microbial oxidation of antimonite and arsenite by bacteria isolated from antimony-contaminated soils." *International Journal of Hydrogen Energy* 42.45 (2017): 27832-27842.
- Deng, Renjian, et al. "A Critical Review of Resistance and Oxidation Mechanisms of Sb-Oxidizing Bacteria for the Bioremediation of Sb (III) Pollution." *Frontiers in microbiology* (2021): 2418.
- Filella, Montserrat, Nelson Belzile, and Yu-Wei Chen. "Antimony in the environment: a review focused on natural waters: I. Occurrence." *Earth-science reviews* 57.1-2 (2002): 125-176.
- Filella, Montserrat, Peter A. Williams, and Nelson Belzile. "Antimony in the environment: knowns and unknowns." *Environmental Chemistry* 6.2 (2009): 95-105.
- Filella, Montserrat. "8: Alkyl Derivatives of Antimony in the Environment." *Organometallics in environment and toxicology* (2010): 267-301.
- Gu, Jihai, et al. "Sb (III)-resistance mechanisms of a novel bacterium from non-ferrous metal tailings." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 186 (2019): 109773.

Gupta, Richa, and Amita Mittal. "Bioremediation: an inexpensive yet effective strategy for remediation of heavy metal contaminated sites." *Int J Adv Res* 4.4 (2016): 519-530.

Halder, Arun Kumar, Pradip Sen, and Syamal Roy. "Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions." *Molecular biology international* 2011 (2011).

He, Qiaochong, et al. "Enhanced biological antimony removal from water by combining elemental sulfur autotrophic reduction and disproportionation." *Journal of Hazardous Materials* 434 (2022): 128926.

He, Mengchang, et al. "Antimony speciation in the environment: Recent advances in understanding the biogeochemical processes and ecological effects." *Journal of Environmental Sciences* 75 (2019): 14-39.

Herath, Indika, Meththika Vithanage, and Jochen Bundschuh. "Antimony as a global dilemma: Geochemistry, mobility, fate, and transport." *Environmental pollution* 223 (2017): 545-559.

Hockmann, Kerstin, et al. "Release of antimony from contaminated soil induced by redox changes." *Journal of Hazardous Materials* 275 (2014): 215-221.

Hu, Xingyun, et al. "pH-dependent release characteristics of antimony and arsenic from typical antimony-bearing ores." *Journal of environmental sciences* 44 (2016): 171-179.

Hurst, Christon J. "Microbial Metabolism of Metals and Metalloids." (2022).

Kulp, Thomas R., et al. "Microbiological reduction of Sb (V) in anoxic freshwater sediments." *Environmental science & technology* 48.1 (2014): 218-226.

Lehr, Corinne R., Des R. Kashyap, and Timothy R. McDermott. "New insights into microbial oxidation of antimony and arsenic." *Applied and environmental microbiology* 73.7 (2007): 2386-2389.

Li, He, et al. "Removal of Antimony in Wastewater by Antimony Tolerant Sulfate-Reducing Bacteria Isolated from Municipal Sludge." *International Journal of Molecular Sciences* 23.3 (2022): 1594.

Li, Jie, et al. "Phylogenetic and genome analyses of antimony-oxidizing bacteria isolated from antimony mined soil." *International Biodeterioration & Biodegradation* 76 (2013): 76-80.

Li, Jingxin, et al. "Microbial antimony biogeochemistry: enzymes, regulation, and related metabolic pathways." *Applied and environmental microbiology* 82.18 (2016): 5482-5495.

Long, Jiumei, et al. "The effect of an antimony resistant bacterium on the iron plaque fraction and antimony uptake by rice seedlings." *Environmental Pollution* 258 (2020): 113670.

Long, Xiaojing, et al. "A review of removal technology for antimony in aqueous solution." *Journal of Environmental Sciences* 90 (2020): 189-204.

Loni, Prakash C., et al. "Mechanism of microbial dissolution and oxidation of antimony in stibnite under ambient conditions." *Journal of hazardous materials* 385 (2020): 121561.

Mu, Zi-Qi, Da-Mao Xu, and Rong-Bing Fu. "Insight into the Adsorption Behaviors of Antimony onto Soils Using Multidisciplinary Characterization." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19.7 (2022): 4254.

Multani, Ravinder S., Thomas Feldmann, and George P. Demopoulos. "Antimony in the metallurgical industry: A review of its chemistry and environmental stabilization options." *Hydrometallurgy* 164 (2016): 141-153.

Nathalie, Antoine Pierart Muhammad Shahid. "Antimony bioavailability: knowledge and research." *Environ. Sci* 25 (2013): 2451-2459.

Nguyen, Dinh Duc, Myung-Gyu Ha, and Ho Young Kang. "Potential of versatile bacteria isolated from activated sludge for the bioremediation of arsenic and antimony." *Journal of Water Process Engineering* 39 (2021).

Nguyen, Van Khanh, and Jong-Un Lee. "Isolation and characterization of antimony-reducing bacteria from sediments collected in the vicinity of an antimony factory." *Geomicrobiology Journal* 31.10 (2014): 855-861.

Okkenhaug, Gudny, et al. "Antimony (Sb) contaminated shooting range soil: Sb mobility and immobilization by soil amendments." *Environmental science & technology* 47.12 (2013): 6431-6439.

Park, Younghyun, and Taeho Lee. "Microbial antimonate reduction with a solid-state electrode as the sole electron donor: A novel approach for antimony bioremediation." *Journal of hazardous materials* 377 (2019): 179-185.

Periferakis, Argyrios, et al. "Availability, Toxicology and Medical Significance of Antimony." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19.8 (2022): 4669.

Pierart, Antoine, et al. "Antimony bioavailability: knowledge and research perspectives for sustainable agricultures." *Journal of hazardous materials* 289 (2015): 219-234.

Salmassi, Tina M., et al. "Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California." *Geomicrobiology Journal* 19.1 (2002): 53-66.

Sun, Fuhong, et al. "Biosorption of antimony (V) by freshwater cyanobacteria *Microcystis* biomass: chemical modification and biosorption mechanisms." *Chemical Engineering Journal* 171.3 (2011): 1082-1090.

Sun, Li-Na, et al. "Genomic and physiological characterization of an antimony and arsenite-oxidizing bacterium *Roseomonas rhizosphaerae*." *Environmental Research* 191 (2020): 110136.

Sun, Weimin, et al. "Profiling microbial community in a watershed heavily contaminated by an active antimony (Sb) mine in Southwest China." *Science of the Total Environment* 550 (2016): 297-308.

Tchounwou, Paul B., et al. "Heavy metal toxicity and the environment." *Molecular, clinical, and environmental toxicology* (2012): 133-164.

Terry, Lee R., et al. "Microbiological oxidation of antimony (III) with oxygen or nitrate by bacteria isolated from contaminated mine sediments." *Applied and Environmental Microbiology* 81.24 (2015): 8478-8488.

Tschan, Martin, et al. "Antimony uptake and toxicity in sunflower and maize growing in SbIII and SbV contaminated soil." *Plant and soil* 334.1 (2010): 235-245.

Ullrich, Maria K., et al. "Sulfur redox chemistry governs diurnal antimony and arsenic cycles at Champagne Pool, Waiotapu, New Zealand." *Journal of volcanology and geothermal research* 262 (2013): 164-177.

Verbeeck, Mieke, et al. "Soil organic matter increases antimonate mobility in soil: An Sb (OH) 6 sorption and modeling study." *Applied Geochemistry* 104 (2019): 33-41.

Vidali, Mn. "Bioremediation. an overview." *Pure and applied chemistry* 73.7 (2001): 1163-1172.

Wan, Xiao-ming, et al. "Changes in Sb speciation with waterlogging of shooting range soils and impacts on plant uptake." *Environmental Pollution* 172 (2013): 53-60.

Wang, Dan, et al. "Disrupting ROS-protection mechanism allows hydrogen peroxide to accumulate and oxidize Sb (III) to Sb (V) in *Pseudomonas stutzeri* TS44." *BMC microbiology* 16.1 (2016): 1-11.

Wang, Qingyun, et al. "The impact of phosphate on the interaction of Sb (III) with ferrous sulfide." *Applied Geochemistry* 140 (2022): 105297.

Wilson, Susan C., et al. "The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: a critical review." *Environmental pollution* 158.5 (2010): 1169-1181.

Wu, Fengchang, et al. "Removal of antimony (III) from aqueous solution by freshwater cyanobacteria *Microcystis* biomass." *Chemical Engineering Journal* 183 (2012): 172-179.

Xiang, Li, et al. "Antimony transformation and mobilization from stibnite by an antimonite oxidizing bacterium *Bosea* sp. AS-1." *Journal of Environmental Sciences* 111 (2022): 273-281.

Yamamura, Shigeki, et al. "Production of two morphologically different antimony trioxides by a novel antimonate-reducing bacterium, *Geobacter* sp. SVR." *Journal of Hazardous Materials* 411 (2021): 125100.

Zhang, Guoping, et al. "Bioremoval of antimony from contaminated waters by a mixed batch culture of sulfate-reducing bacteria." *International Biodeterioration & Biodegradation* 115 (2016): 148-155.

Zhang, Yang, et al. "A review of the environmental chemical behavior, detection, and treatment of antimony." *Environmental Technology & Innovation* 24 (2021): 102026.

Zhang, Yidan, Edward J. O'Loughlin, and Man Jae Kwon. "Antimony redox processes in the environment: A critical review of associated oxidants and reductants." *Journal of hazardous materials* (2022): 128607.

Zhu, YanMing, et al. "Factors influencing the uptake and speciation transformation of antimony in the soil-plant system, and the redistribution and toxicity of antimony in plants." *Science of the Total Environment* 738 (2020): 140232.

Zhu, YanMing, et al. "Toxicity of different forms of antimony to rice plants: Effects on reactive oxidative species production, antioxidative systems, and uptake of essential elements." *Environmental Pollution* 263 (2020): 114544.

Έντυπη Βιβλιογραφία

Βιολογία των μικροοργανισμών, Madigan, Martinko, Bender, Buckley, Stahl, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2021.

Γενική Χημεία, Ebbing Gammon, 2011.

Εισαγωγή στη Βιοχημική Μηχανική, Γεράσιμος Λυμπεράτος, 1999.

Οικολογία, Οικοσυστήματα και προστασία του περιβάλλοντος, Κίμων Χατζημπίρος.

Οι μηχανές της ζωής, Paul G. Falkowski.

Διαδίκτυο

<https://www.britannica.com>

<http://earthscience.stackexchange.com>

<http://ebooks.edu.gr/>

<https://en.wikipedia.org>

<https://www.epa.gov/>

<https://www.hindawi.com/>

<http://www.ncheurope.com/>

<http://polarpedia.eu/el/>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<https://www.upatras.gr/>
<https://www.YouTube.com>
http://195.134.76.37/chemicals/chem_glucose.htm